

Charakterisierung von neuen monoklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen den Endothelin- Rezeptor A

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Alexander Heeb
geboren am 07.11.1978 in Frunse (ehem. UdSSR)**

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp, Jena
2. Prof. Dr. phil. med. Gustav Jirikowski, Jena
3. Prof. Dr. med. Harald Groeben, Essen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. November 2019

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	3
1.	Zusammenfassung	4
2.	Einleitung	7
2.1.	Endotheline	7
2.2.	Endothelin-Rezeptoren	12
2.3.	Pathophysiologische Rolle der Endotheline	16
2.4.	Endothelin-Rezeptor-Antagonisten	21
2.5.	Antikörper	23
2.5.1.	Herstellung poly- und monoklonaler Antikörper	24
3.	Zielstellung	28
4.	Material und Methoden	29
4.1.	Material	29
4.1.1.	Untersuchungsmaterial	29
4.1.1.1.	Zelllinien	29
4.1.1.2.	Mausgewebe für die Western-Blot-Analysen	29
4.1.1.3.	Paraffinblöcke für die Immunhistochemie	29
4.1.2.	Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
4.1.2.1.	Substanzen für die Immunzytochemie	30
4.1.2.2.	Substanzen für die Western-Blot-Analysen	31
4.1.2.3.	Substanzen für die Immunhistochemie	32
4.1.2.4.	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	32
4.1.3.	Lösungen und Standardpuffer	35
4.1.3.1.	Lösungen und Standardpuffer für die Immunzytochemie	35
4.1.3.2.	Lösungen und Standardpuffer für die Western-Blot-Analysen	36
4.1.3.3.	Lösungen und Standardpuffer für die Immunhistochemie	38
4.1.4.	Verwendete Antikörper	39
4.1.4.1.	Primärantikörper	39
4.1.4.2.	Sekundärantikörper	39
4.2.	Methoden	40
4.2.1.	Zellkultur	40
4.2.2.	Immunzytochemie	40
4.2.3.	Rezeptoranreicherung aus Zellen und Geweben, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analysen	41
4.2.3.1.	Aufbereitung der HEK-293-Zellen	41
4.2.3.2.	Aufbereitung der Gewebeproben	42

4.2.3.3.	Isolierung der Membranproteine mittels WGA-Beads	42
4.2.3.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
4.2.3.5.	Western-Blot-Analysen	43
4.2.4.	Immunhistochemie	44
4.2.4.1.	Peptidneutralisation	48
5.	Ergebnisse	49
5.1.	Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen	49
5.2.	Western-Blot-Analysen	49
5.2.1.	Western-Blot-Analysen an HEK-293-Zellen	49
5.2.2.	Western-Blot-Analysen an normalen Mausgeweben	50
5.3.	Immunhistochemische Untersuchungen	51
5.3.1.	Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Rattengeweben	51
5.3.2.	Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Mausgeweben	54
5.3.3.	Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Humangeweben	56
5.3.4.	Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumoren	58
5.3.5.	Vorbehandlung der Schnitte mit Lambda-Protein-Phosphatase und Peptidneutralisationen	62
6.	Diskussion	65
6.1.	Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen	65
6.2.	Western-Blot-Analysen	65
6.3.	Immunhistochemische Untersuchungen	67
6.3.1.	Immunhistochemische Untersuchungen an Normalgeweben der Ratte, der Maus und des Menschen	67
6.3.2.	Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumoren	69
6.3.3.	Einfluss einer Vorbehandlung der Schnitte mit Lambda-Protein-Phosphatase und Peptidneutralisationen	78
7.	Schlussfolgerungen	79
8.	Literaturverzeichnis	80
9.	Anhang	100
9.1.	Lebenslauf und Veröffentlichung	100
9.2.	Ehrenwörtliche Erklärung	102
9.3.	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET-1/-2/-3	Endothelin-1/-2/-3
ETA	Endothelin-Rezeptor A
ETB	Endothelin-Rezeptor B
FKS	Fötales Kälberserum
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEK-293-Zellen	humane embryonale Nieren-Zellen 293
λ -PP	Lambda-Protein-Phosphatase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS/RSA 5%	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 5% Rinderserumalbumin
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPBS	Tris-gepufferte Salzlösung mit Thiomersal
WGA	Weizenkeimagglutinin

1. Zusammenfassung

Die Endotheline Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) sind eine Familie von Peptiden, die ihre Wirkung über zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Subtypen, Endothelin-Rezeptor A (ETA) und Endothelin-Rezeptor B (ETB), vermitteln. Während der ETA eine höhere Affinität für ET-1 und ET-2 aufweist, bindet der ETB alle drei Endotheline vergleichbar gut. Sowohl der ETA als auch der ETB werden von Kardiomyozyten, der Gefäß- und Bronchialmuskulatur, von Neuronen, Osteoblasten und Fibroblasten sowie im reproduktiven System exprimiert. Der ETA wurde zusätzlich auf den Ito-Zellen der Leber sowie auf Melanozyten, Keratinozyten und Adipozyten, der ETB dagegen auf Gefäßendothelzellen, Nierentubuluszellen, Hepatozyten, Makrophagen, Thrombozyten und in endokrinen Geweben nachgewiesen. Das ET-1 ist die am weitesten verbreitete Endothelin-Isoform. Es wirkt (über den ETA) als potenter Vasokonstriktor und ist an der Entstehung verschiedener kardiovaskulärer und renaler Krankheiten beteiligt, wie der Herzinsuffizienz, der arteriellen und pulmonalarteriellen Hypertonie, der diabetischen Nephropathie und der hypertensiven Nephrosklerose.

Aus der Literatur ist bereits seit längerem eine Überexpression des ETA bei einer Vielzahl von Tumoren bekannt. Hierbei wird dem Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Signalwegen, die in die Zellproliferation, in anti-apoptotische Effekte, die Invasion, Metastasierung, epithelial-mesenchymale Transition, Immunmodulation, und Tumor-Neoangiogenese involviert sind, zugeschrieben, weshalb ihm eine zunehmende Bedeutung als molekulares Target in der Tumordiagnostik und -therapie zukommt. Doch obwohl bereits zahlreiche kleinmolekulare Rezeptor-Antagonisten existieren, haben diese in der Behandlung von Tumoren noch keinen Eingang in den Klinikalltag gefunden. Hauptgrund hierfür ist, dass für den für eine Therapie notwendigen Nachweis der Rezeptoren bisher größtenteils nur polyklonale Antikörper erhältlich waren, die, bedingt durch ihre Herstellungsweise, nur begrenzt zur Verfügung standen und zum Teil unspezifisch waren, weshalb diese Antikörper für den alltäglichen Gebrauch in der Klinik ungeeignet sind. Daher wurde vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena in Zusammenarbeit mit der Firma Epitomics, Burlingame, CA, USA, der monoklonale Kaninchen-Antikörper UMB-8 entwickelt, der gegen die carboxy-terminale Sequenz des humanen ETA gerichtet ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, den Anti-ETA-Antikörper UMB-8 detailliert hinsichtlich seiner Spezifität zu charakterisieren und anschließend anhand einer großen Serie an formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten humanen Normal- und Tumorgewebe zu testen. Hierfür wurden immunzytochemische Untersuchungen an mit dem ETA transfizierten HEK-293-Zellen, Western-Blot-Analysen an mit dem ETA transfizierten HEK-203-Zellen und an Mausgeweben sowie immunhistochemische Färbungen an normalen

Ratten-, Maus- und Humangeweben sowie an humanen Tumorpräparaten durchgeführt. Zusätzlich erfolgten Peptidneutralisationen.

Im Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen konnte die Spezifität des monoklonalen Anti-ETA Antikörpers UMB-8 eindeutig belegt werden. So konnte in Western-Blot-Analysen von mit dem ETA transfizierten HEK-293-Zellen und von verschiedenen Mausgewebe-Präparationen eine breite Bande im Bereich von 60 bis 90 kD, dem erwarteten Molekulargewicht des glykosylierten Rezeptors, detektiert werden, nicht jedoch in nicht-transfizierten HEK-293-Zellen. Weiterhin zeigte sich eine membranständige und nur geringe zytoplasmatische immunzytochemische Färbung von mit dem ETA transfizierten HEK-293-Zellen, welche sich nach Stimulation mit dem Agonisten Endothelin-1 in das Zytosol verlagerte, entsprechend einer agonist-induzierten Internalisierung der Rezeptoren. In nicht-transfizierten Zellen fand sich dagegen kein Immunsignal. Auch in mit Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben der Ratte, der Maus und des Menschen konnte eine hauptsächlich membranständige, teilweise aber auch zytoplasmatische Färbung bestimmter Zellpopulationen in den aus der Literatur bekannten Lokalisationen wie Herzvorhöfen oder Gefäßen verzeichnet werden. Schließlich konnten sowohl die Banden in den Western-Blot-Analysen als auch die immunhistochemischen Färbungen durch eine Vorinkubation des Antikörpers mit dem zur Immunisierung des Kaninchens verwendeten Peptid vollständig neutralisiert werden.

Nach erfolgter Charakterisierung wurde der UMB-8 an einer großen Serie von Normalgeweben der Ratte und der Maus und von humanen Normal- und Tumorgeweben getestet. In den Normalgeweben konnte der ETA in allen drei Spezies insbesondere im Herzen, und hier vor allem in den Vorhöfen, in den Gefäßen (glatte Gefäßmuskulatur, Kapillaren), in der menschlichen Placenta sowie im Bindegewebe (Kapillaren, Fibroblasten, Fibrozyten) fast aller Organe nachgewiesen werden. Am eindrücklichsten zeigte sich die Färbung dieser Bindegewebskomponenten im Herzen, im Magen, im Darm, im Pankreas, in den Nieren und in den Hoden. In der Lunge fand sich eine Expression des ETA in den Kapillaren der Alveolarsepten sowie in der Muskulatur der größeren Gefäße und der Bronchien. In den Nieren waren neben den größeren Gefäßen und den Kapillaren (z.B. Vasa recta) auch die afferenten und die efferenten Arteriolen der Glomeruli sowie einzelne glomeruläre Mesangiumzellen ETA-positiv. Eine deutliche ETA-Expression zeigte sich auch in den aktivierten Ito-Zellen menschlicher zirrhotischer Lebern. Stark ETA-positiv waren zudem beim Menschen fibroblastische Retikulumzellen, was besonders in der roten Pulpa der Milz und um die Follikel der Lymphknoten herum zu beobachten war. Dieser Befund konnte bei der Ratte und der Maus nicht erhoben werden.

Bei den untersuchten Tumoren wurde eine starke ETA-Expression in allen untersuchten Sarkom-Entitäten sowie in Glioblastomen und in Schilddrüsen-, Ovarial- und

hepatozellulären Karzinomen beobachtet. Der ETA zeigte sich auch im Stroma (Kapillaren, Fibroblasten, Fibrozyten) zahlreicher epithelialer Tumore, wie Pankreas-, Nieren-, Harnblasen-, Prostata-, Mamma- und Cervix-Karzinomen sowie in Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST). In Lungen- und in Magentumoren, in Phäochromozytomen, in neuroendokrinen Tumoren und in Hämangiomen war die ETA-Expression dagegen entweder nur schwach ausgeprägt oder der Rezeptor nicht nachweisbar.

Insgesamt konnte durch die vorliegende Arbeit belegt werden, dass sich der neu entwickelte Antikörper UMB-8 aufgrund seiner Spezifität für die Detektion des ETA hervorragend eignet. Er kann sowohl für Western-Blot-Analysen an Zellen und Geweben und für immunzytochemische Untersuchungen als auch für immunhistochemische Analysen an Paraffinschnitten sowohl der Ratte, der Maus als auch des Menschen eingesetzt werden. Somit kann der monoklonale Antikörper UMB-8 zum einen für die weitere Erforschung der Signalwege des ETA und ihrer Regulation Verwendung finden, zum anderen ist er aber auch sehr gut für die pathologische Routinediagnostik zur Ermittlung des Rezeptor-Expressionsprofils von Tumoren geeignet.

2. Einleitung

2.1. Endotheline

Bei seinen Bemühungen, einen neuen vasoaktiven Faktor zu identifizieren, fand Robert Furchgott bereits Anfang der 1980er Jahre heraus, dass von Endothelzellen gefäßtonus-modulierende Substanzen gebildet werden können (Furchgott und Zawadzki 1980). Der Arbeitsgruppe um Yanagisawa gelang schließlich 1988 ein Peptidhormon, welches bis dato die stärkste vasokonstriktorische Wirkung aufwies, aus dem Überstand vaskulärer Endothelzellen der Schweineaorta zu isolieren, zu sequenzieren und seine Vorstufe, das Präendothelin, zu klonieren. Entsprechend seinem Ursprungsort wurde dieses Peptid Endothelin (ET) genannt (Yanagisawa et al. 1988). Bei der Analyse einer humanen DNA-Bibliothek im Jahr 1989 wurden zwei weitere Isoformen des Endothelins entdeckt, die jeweils von eigenständigen, auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierten Genen codiert werden. Das zuerst entdeckte Peptid erhielt den Namen Endothelin-1 (ET-1), die beiden weiteren Isoformen Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) (Inoue et al. 1989).

Jede Endothelin-Isoform besteht aus jeweils 21 Aminosäuren mit einem hydrophoben C-terminalen Tryptophanrest und zwei Disulfidbrücken am N-terminalen Ende zwischen den Cysteinresten 1 und 15 sowie zwischen den Cysteinresten 3 und 11, die zu einer charakteristischen Haarnadelform der Moleküle führen. Die Disulfidbrücken und die C-terminale Domäne scheinen für die Wirksamkeit des Peptids entscheidend zu sein, da ihre Entfernung zum Verlust der biologischen Aktivität führt (Kimura et al. 1988, Randall et al. 1989). Das ET-1 unterscheidet sich in seiner Sequenz vom ET-2 durch zwei und vom ET-3 durch sechs Aminosäuren (Inoue et al. 1989, Haynes und Webb 1998) (Abbildung. 1).

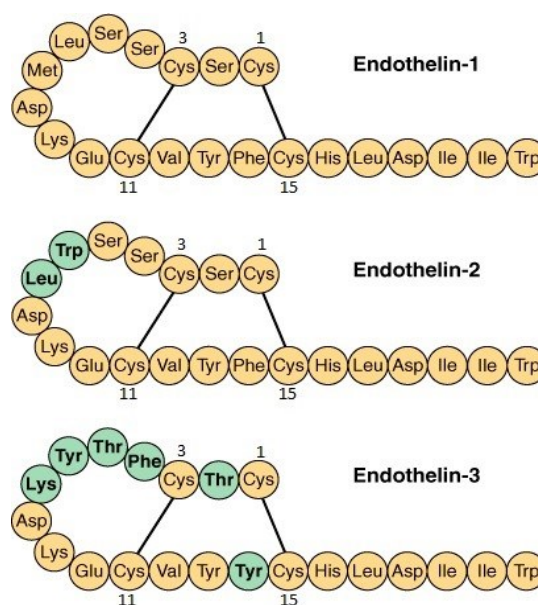


Abbildung 1: Primärstruktur der Endothelin-Isoformen. Grün dargestellte Aminosäuren kennzeichnen Abweichungen zum Endothelin-1 (modifiziert nach McPhee 2010).

Die genetische Information für die Vorläufer (Präproform) der ET-Isoformen befindet sich beim Menschen für das ET-1 auf Chromosom 6, für das ET-2 auf Chromosom 1 und für das ET-3 auf Chromosom 20 (Arinami et al. 1991). Die Gensequenz von ET-1 besteht aus fünf Exons und vier Introns, wobei sich die Sequenz des aktiven Peptids im zweiten Exon befindet. Die Promotorregion enthält zur Regulierung der Transkription eine typische CAAT- und TATA-Box sowie mehrere zusätzliche Cis-wirkende Elemente. Diese Cis-wirkenden Elemente enthalten eine AP-1-Bindungsstelle, an der c-fos- und c-jun-Heterodimere binden können, sowie Bindungsstellen für das GATA-2-Protein, welche entscheidend sind für eine Basaltranskription oder regulierte Transkription in der ET-1-Biosynthese in den Endothelzellen. Dadurch kann eine Vielzahl von lokalen Mediatoren, vasoaktiven Substanzen und physikalisch-chemischen Faktoren die Genexpression und die Freisetzung des ET-1 regulieren (Inoue et al. 1989, Lee et al. 1990, Wilson et al. 1990, Attina et al. 2005, Shah et al. 2007, Dhaun et al. 2007) (siehe Tabelle 1).

Die Biosynthese der Endotheline erfolgt über mehrere proteolytische Schritte, die im Folgenden aufgrund seiner dominierenden Stellung unter den Isoformen exemplarisch am ET-1 dargestellt werden sollen (Yanagisawa et al 1989). Nach der Transkription wird aus der Präpro-ET-1-mRNA ein Vorläuferprotein, das sogenannte Präproendothelin-1 (ppET-1) mit 212 Aminosäuren (AS) translatiert, welches durch die Furin-Endopeptidase oder Proprotein-Convertase 7 (PC7) nach der Entfernung des Signalpeptids im Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums in das aus 38 AS bestehende Big-Endothelin-1 (big-ET-1) umgewandelt wird. Das big-ET-1 hat eine 140-fach geringere vasokonstriktorische Wirkung/Potenz als das aus ihm im letzten Schritt der Biosynthese entstehende ET-1 mit 21 AS. An diesem letzten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Endothelin-Biosynthese ist hauptsächlich das Endothelin-Converting-Enzym (ECE) beteiligt, welches in drei Isoformen unterteilt wird, ECE-1, ECE-2 und ECE-3. Zu einem geringen Anteil wird aus big-ET-1 durch Chymasen und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) ein aus 31 AS bestehendes ET-1 gebildet, welches durch die Neutrale Endopeptidase 24-11 (NEP) in das aus 21 AS bestehende ET-1 umgewandelt werden kann. Die Biosynthese von ET-2 und ET-3 verläuft in analoger Weise aus größeren Vorläuferproteinen (Matsumura et al. 1990, Rubanyi und Polokoff 1994, Xu et al. 1994, Denault et al. 1995, Hayasaki-Kajiwara et al. 1999, Blais et al. 2002, De Campo et al. 2002) (siehe Abbildung 2).

Tabelle 1: Regulatorische Faktoren der ET-1-Biosynthese und -Sekretion (Attina et al. 2005, Shah et al. 2007, Dhaun et al. 2007).

Stimuli	Inhibitoren
Vasokonstriktoren: <ul style="list-style-type: none"> - Angiotensin II - Vasopressin - Noradrenalin - Adrenalin Thrombogene Substanzen: <ul style="list-style-type: none"> - Thrombin Zytokine und Wachstumsfaktoren: <ul style="list-style-type: none"> - Interleukin-1 und -2 - Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) - GM-CSF - Interferon-γ (IFN-γ) - Transforming growth factor β (TGF-β) - Endotoxin Physikochemische Faktoren: <ul style="list-style-type: none"> - Mechanische Belastung - Druck ohne Zellverformung - Hypoxie - Hämodynamischer Überdruck - Niedrige Scherkräfte - Azidose Sonstige Faktoren: <ul style="list-style-type: none"> - Insulin - Serotonin - Corticosteroide - Erythropoietin - Oxidiertes LDL - Cyclosporine - Cocain - Glucose - Cholesterin - Atherosklerotische Läsionen - Leptin 	Vasodilatoren: <ul style="list-style-type: none"> - NO - Bradykinin - Prostaglandine E2 und I2 - ANP - BNP Antikoagulantien: <ul style="list-style-type: none"> - Heparin - Hirudin Physikochemische Faktoren: <ul style="list-style-type: none"> - Hohe Scherkräfte Sonstige Faktoren: <ul style="list-style-type: none"> - Östrogene - Progesteron - Nitrate - Montelukast - Thiazolidindione - Fibrate - Betablocker

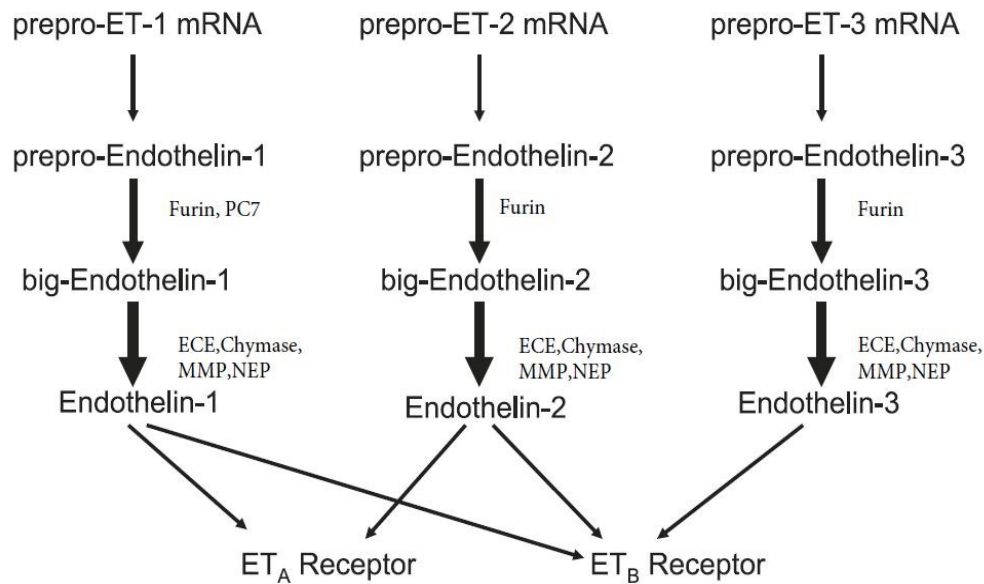


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Endothelinbiosynthese (modifiziert nach Barton und Yanagisawa 2008).

Es gibt zwei unterschiedliche Mechanismen der ET-1-Sekretion. Einer der Mechanismen ist die Freisetzung durch Exozytose aus den Weibel-Palade-Körperchen nach chemischen Stimuli, Hypothermie oder mechanischer Scherspannung, einschließlich Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma. Der andere Mechanismus, welcher in den meisten Endothelinproduzierenden Zellen stattfindet, ist die konstitutive Sekretion. Durch die konstitutive Sekretion wird eine größere Menge an ET-1 freigesetzt als durch die Exozytose. Dadurch scheint es der primäre Freisetzungsmechanismus zu sein, bei welchen die Regulation auf der Ebene der Transkription durch eine Vielzahl von Faktoren stattfindet (Russell et al. 1998, 1999, Khimji und Rockey 2010) (siehe Tabelle 1).

Die Sekretion von ET-1 erfolgt zu ca. 80% basolateral (parakrin) und zu ca. 20% luminal (endokrin). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass es sich hauptsächlich um ein Hormon mit einem para- und autokrinen Wirkmechanismus handelt (Wagner et al. 1992).

Während die Plasmahalbwertszeit des Endothelin-1 mit ca. 2-5 Minuten sehr kurz ist, sind die biologischen Effekte des Peptides länger anhaltend und je nach Zielgewebe bis zu 120 Minuten nachweisbar, was auf einen Post-Rezeptor-Effekt zurückgeführt wird. Der Abbau erfolgt größtenteils in der Lunge und zu einem geringeren Anteil in der Leber und in den Nieren. Dabei wird das ET-1 entweder durch den ETB-Rezeptor internalisiert, mit anschließendem Abbau in lysosomalen Kompartimenten, oder durch die neutrale Endopeptidase hydrolysiert (Abassi et al. 1993, Jackman et al. 1993, Kruse et al. 1997, Luscher und Barton 2000).

Endotheline werden von einer Vielzahl von Zelltypen und Geweben exprimiert. Die Syntheseraten in den verschiedenen Geweben unterscheiden sich stark. Die größte Menge an ET-1 wird von den Endothelzellen gebildet. Es wird aber auch von epithelialen Zellen der Lunge, Kardiomyozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, zerebralen Neuronen, Astrozyten, Mesangialzellen der Nieren, Inselzellen des Pankreas, Hepatozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Sertoli-Zellen des Hodens, Endometriumzellen und Epithelzellen der Brust gebildet. ET-1 vermittelt eine Vielzahl an akuten und chronischen Effekten in verschiedenen Geweben. Es trägt unter physiologischen Bedingungen zur Erhaltung und Regulation des basalen Gefäßtonus und Blutdrucks bei. Am Herzen führt es zur Konstriktion koronarer Arterien, zu einer positiven Chrono- und Inotropie und zu einer Hypertrophie kardialer Myozyten. Es stimuliert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, indem es die Reninfreisetzung begünstigt, und es fördert die Reabsorption von Wasser aus dem Harn. Durch Konstriktion der afferenten Arteriolen werden die renale Durchblutung und die glomeruläre Filtrationsrate vermindert, was eine reduzierte Diurese zur Folge hat. Broncho- und pulmonal vasokonstringierende Wirkungen sowie Leukozyten-stimulierende und mitogene Effekte, wie die Stimulation des Wachstums von Melanozyten und von Tumorzellen, wurden ebenfalls nachgewiesen. Es wird vermutet, dass ET-1 proinflammatorische Prozesse auslöst. Dafür spricht die aggregationsverstärkende Wirkung auf Neutrophile, die Stimulation der Elastasefreisetzung, der Bildung toxischer Sauerstoffradikale und der Eicosanoid-Synthese in Makrophagen und Monozyten sowie die Erhöhung der Freisetzung von Interleukinen und des Plättchen-aktivierenden Faktors. Außerdem steigert ET-1 in den Atemwegen die Proliferation der Gefäße und der Muskelzellen. Weiterhin führt es zu einer Zunahme der Sekretion von Vasopressin und von Katecholaminen (MacCumber et al. 1989, Shinmi et al. 1989, Ehrenreich et al. 1990, Fujisaki et al. 1990, Rozengurt et al. 1990, Suzuki et al. 1993, Grohé et al. 1994, Yu und Davenport 1995, Iqbal et al. 2005, Ortmann et al. 2005, Barton und Yanagisawa 2008).

ET-2 wird im Magen-Darm-Trakt, in den Nieren, im Myokard, in der Lunge, in der Plazenta, im Chorion und Amnion, in den Ovarien und im Uterus gebildet. Außerdem konnte in der Hypophyse und in der Medulla oblongata ein höherer Spiegel an ET-2- als an ET-1-mRNA nachgewiesen werden. Die ET-2-Konzentration im Plasma beträgt nur ein Fünftel der ET-1-Level. Bei In-vitro-Untersuchungen an Gefäßen wies ET-2 die gleiche vasokonstriktorische Potenz wie ET-1 auf. Laut Literatur spielt ET-2 möglicherweise bei der Lungenentwicklung, bei der Thermoregulation, bei der Ovulation, bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei der Tumorgenese eine Rolle (Bloch et al. 1991, O'Reilly et al. 1993, Kedzierski und Yanagisawa 2001, Masuo et al. 2003, Uchide et al. 2004, Davenport and Maguire 2006, Ko et al. 2006, Meidan und Levy 2007, Ling et al. 2013).

ET-3 konnte in hohen Konzentrationen hauptsächlich im ZNS und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde entweder ET-3 selbst oder die ET-3 mRNA in den Augen, in der Glandula submandibularis, der Lunge, den Nieren, der Milz und sowie in Mastzellen und Makrophagen im Gastrointestinaltrakt detektiert. Im ZNS ist ET-3 an der Entwicklung und Proliferation von Astrozyten und Neuronen beteiligt. Im Gastrointestinaltrakt scheint der ET-3/ETB-Signalweg bei der Entwicklung des myenterischen Nervenplexus eine Rolle zu spielen. Es sind auch Mutationen des ET-3-Gens im Zusammenhang mit dem Morbus Hirschsprung bekannt (Matsumoto et al. 1989, Shiba et al. 1992, Liu et al. 1998, Tanaka et al. 1998, Davenport und Maguire 2006).

2.2. Endothelin-Rezeptoren

Die hydrophilen ET-Peptide vermitteln ihre biologischen Wirkungen über spezifische G-Protein-gekoppelte ETA- und ETB-Rezeptoren, die erstmals 1990 beim Rind von Arai et al. und bei der Ratte von Sakurai et al. beschrieben worden sind. Die humane Sequenz der Rezeptorsubtypen konnte für den ETA-Rezeptor von Hosoda et al. 1992 und für den ETB-Rezeptor von Arai et al. 1993 aufgeklärt werden. Zusätzlich konnte ein ETC-Rezeptor mit einer hohen Affinität für das ET-3 bei der Froschart *Xenopus laevis* nachgewiesen werden, allerdings bisher nicht beim Menschen. Der ETA-Rezeptor ist Isoform-selektiv und besitzt eine hohe Affinität zum ET-1 und zum ET-2, aber eine niedrige zum ET-3, während der ETB-Rezeptor unselektiv alle drei ET-Isopeptide mit gleicher Affinität bindet. Der humane ETA-Rezeptor besteht aus 427 Aminosäuren und wird von einem aus acht Exons und sieben Introns umfassenden, auf dem Chromosom 4 lokalisierten Gen codiert. Die genetische Information für den aus 442 Aminosäuren bestehenden humanen ETB-Rezeptor befindet sich auf dem Chromosom 13. Die Gensequenz umfasst sieben Exons und sechs Introns. Beide Rezeptoren bestehen aus dem extrazellulären N-Terminus, sieben Transmembrandomänen, drei intra- und drei extrazellulären Schleifen und dem zytoplasmatischen C-Terminus. Endothelin-Rezeptoren haben eine Größe von 45 bis 50 kDa. Die Aminosäuresequenzen der Endothelin-Rezeptoren verschiedener Spezies weisen teilweise eine große Übereinstimmung auf. So beträgt die Übereinstimmung des humanen ETA-Rezeptors mit dem ETA-Rezeptor der Ratte 91% und mit dem des Rindes 94%, die des humanen ETB-Rezeptors mit dem ETB-Rezeptor der Ratte 88% und mit dem des Rindes 89%. Die Aminosäuresequenzen der zwei humanen Subtypen, ETA-Rezeptor und ETB-Rezeptor, sind zu etwa 59% identisch. Sie unterscheiden sich vor allem am extrazellulären N-Terminus und am zytoplasmatischen C-Terminus (Arai et al. 1990, Sakurai et al. 1990, Hosoda et al. 1992, Hayzer et al. 1992, Arai et al. 1993, Karne et al. 1993, Rubanyi und Polokoff 1994, Levin 1995, Davenport 2002).

Die Produktion von ET-Rezeptoren wird von mehreren Faktoren reguliert. In einigen Geweben kann eine Hochregulation der Expression von ETA-Rezeptoren durch Hypoxie, epidermalen Wachstumsfaktor, basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor, cAMP und Östrogene sowie eine Induktion der Expression von ETB-Rezeptoren durch C-Typ natriuretisches Peptid (CNP), Angiotensin II und basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor erfolgen. Im Gegensatz dazu führen Endotheline, Angiotensin II, Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und Transforming Growth Factor (TGF) bei ETA-Rezeptoren sowie cAMP und Katecholamine bei ETB-Rezeptoren zu einer Herabregulation der Expression (Shah 2007).

In den systemischen und pulmonalen Gefäßen befinden sich ETA-Rezeptoren primär auf den glatten Gefäßmuskelzellen, während ETB-Rezeptoren sowohl auf den Endothelzellen als auch auf den glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert werden. Theoretisch kann man davon ausgehen, dass die mRNA der ET-Rezeptoren in allen Geweben und Organen mit einer Blutversorgung vorkommt. Insgesamt konnten sowohl ETA- als auch ETB-Rezeptoren in der glatten Muskulatur, in Kardiomyozyten, in Neuronen, in der Lunge, in der Leber, im Pankreas, in der Niere, in Adipozyten, in Fibroblasten, in Osteoblasten, in Thrombozyten, in Makrophagen und in Keratinozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde der ETA-Rezeptor in neutrophilen Granulozyten sowie im Magen, im Darm, in der Prostata, in den Ovarien und in der Plazenta detektiert (Dockrell et al. 1996, Jagroop et al. 2005, Khimji und Rockey 2010, Watts 2010, Davenport et al. 2016).

Die Stimulation von ETA- und ETB-Rezeptoren an der glatten Muskulatur kann sowohl eine Vasokonstriktion als auch eine Zellproliferation vermitteln, während die Aktivierung der ETB-Rezeptoren am Endothel die Freisetzung von gefäßerweiternden und antiproliferativen Faktoren wie NO und Prostacyclin (PGI₂) induziert.

Durch die Aktivierung der Endothelinrezeptoren kommt es zu einer Stimulation der Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Das DAG öffnet rezeptorgesteuerte Kalziumionenkanäle (ROC), während IP₃ eine Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) induziert und SOC-Kalziumionenkanäle (Store-operated channels) öffnet, was zu einer weiteren Erhöhung der Kalziumionenkonzentration im Zytosol führt. Diese Erhöhung kann eine weitere Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Ryanodinrezeptoren auslösen. Eine Depolarisation, aufgrund einer Öffnung von nicht-selektiven Kationenkanälen (NSCC) sowie einer Öffnung der Chloridkanäle und einer Blockade der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv) durch intrazelluläre Kalziumionen, führt zu einer Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (VDCC) mit einem zusätzlichen intrazellulären Kalziumeinstrom. Eine Zunahme des Kalziums im Zytosol kann einen Natrium-Protonen Austauscher aktivieren, was zu einer Alkalisierung der Zelle

und einer Aktivierung eines Natrium-Calcium-Austauschers führt. Die so erhöhte Kalziumionenkonzentration leitet dann eine Vasokonstriktion über Ca^{2+} /Calmodulin und die Myosin-Leichtketten-Kinase ein. Die Vasokonstriktion ist lang anhaltend und bleibt auch dann noch bestehen, wenn kein Endothelin mehr am Rezeptor gebunden ist, wahrscheinlich durch eine weiterhin erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration. Stickstoffmonoxid (NO) verkürzt die Dauer der Kontraktion, indem es die Kalziumionenkonzentration wieder auf basale Werte zurückbringt. Diacylglycerol und Kalzium stimulieren zusätzlich die Proteinkinase C, die die mitogene Wirkung von Endothelin über die extrazelluläre-Signale-regulierten Kinasen (ERKs), welche zur Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehören, vermittelt. Diese aktivieren Transkriptionsfaktoren (c-fos, c-jun, egr-1) sowie Translationsfaktoren (PHAS-I) und führen damit z.B. zu einer erhöhten Proteinsynthese bzw. zur Zellteilung. Zusätzlich kann es bei der Stimulation der ET-Rezeptoren durch Endotheline zu einer Aktivierung der kleinen GTPase Rho und anschließender Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK, Rho-associated coiled coil containing protein kinase) schließlich zur Phosphorylierung und damit Inhibition der Myosin-Leichtkettenkinase kommen. Das führt in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer erhöhten Kontraktion und einer möglichen stressinduzierten Fibrosierung der extrazellulären Matrix. In einem weiteren Signalweg führt die Stimulation des ET-Rezeptors, in Abhängigkeit vom dadurch aktivierten G-Protein-Typ, zur Hemmung oder Aktivierung der Adenylatzyklase und somit zu einer Erhöhung oder Reduktion des cAMP-Spiegels. Zu den bereits genannten Signalwegen konnte in neoplastischen Zellen ein weiterer Signalweg beschrieben werden. Dabei kommt es nach der ETA-Rezeptor-Stimulation zu einer Aktivierung von β -Arrestin. Dieses bewirkt über die intrazelluläre Tyrosin-Kinase (SRC) eine Transaktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) mit darauffolgender Aktivierung der Protein-Tyrosinkinasen (PTK) wie FAK und RAS. Die Protein-Tyrosin-Kinasen führen zu einer Induktion des RAF/MEK/MAPK-Signalweges mit anschließender Stimulation der Transkription von Protoonkogenen wie c-fos, c-myc und c-jun, was wiederum Zellwachstum und Metastasierung aktiviert.

Die intrazelluläre Signalkaskade durch die Aktivierung der ETB-Rezeptoren gleicht der des ETA-Rezeptors, indem die Aktivierung der PLC stimuliert wird, IP₃ und DAG erzeugt werden und Kalzium mobilisiert wird. Dabei unterscheidet man zwischen den auf Endothelzellen nachweisbaren vasodilatativ wirkenden ETB-Rezeptoren, wo eine Erhöhung der Kalziumkonzentration eine Aktivierung der kalziumabhängigen NO-Synthase zur Folge hat, und den auf glatten Gefäßmuskelzellen zu findenden ETB-Rezeptoren, welche eine Kontraktion vermitteln. Außer der erhöhten Produktion und Freisetzung von NO wird die Vasodilatation auch durch das Prostacyclin und die Aktivierung von Kaliumkanälen verursacht. Zusätzlich wird durch die ETB-Rezeptoren eine Phospholipase A₂ (PLA₂)

aktiviert, welche Prostaglandine (PG) und Thromboxan A2 (TXA2) freisetzt. Die beiden ETB-Rezeptoren wurden ursprünglich als zwei verschiedene Rezeptoruntertypen deklariert, nämlich als ETB1- und ETB2-Rezeptor, dabei unterscheiden sich die beiden ETB-Rezeptoren wahrscheinlich eher in ihrer Lokalisation und Funktion als in ihrem molekularen Aufbau. Die Nomenklaturkonferenz der IUPHAR kam 2002 zu dem Schluss, dass anhand der bisher bekannten Agonisten und Antagonisten der Rezeptoren und vor dem Hintergrund der Genloci der Rezeptoren bisher kein Hinweis auf verschiedene Rezeptoruntertypen besteht (Hosoda et al. 1991, Ogawa et al. 1991, Simonson und Herman 1993, Amano et al. 1996, Sugden et al., 1996, Kedzierski und Yanagisawa 2001, Davenport 2002, Nelson et al. 2003a, Sugden 2003, Motte et al. 2006, Khimji und Rockey 2010, Rosano et al. 2013).

Innerhalb eines bestimmten Gewebes kann die Rezeptorverteilung und -dichte variieren und damit die gewebespezifischen biologischen Effekte der Endotheline (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Biologische Effekte der Endotheline in verschiedenen Geweben (Iqbal et al. 2005, Khimji und Rockey 2010).

Gewebe	Rezeptortyp	Biologische Effekte
Endothelzellen	ETB	Regulation des Gefäßtonus, ET-1-Elimination
Herz/Kardiomyozyten	ETA, ETB	positive Chronotropie, positive Inotropie, Hypoxie-induzierte Apoptose, Hypertrophie von kardialen Myozyten
Glatte Muskelzellen	ETA, ETB	Regulation des Muskeltonus, Zellproliferation
Myofibroblasten	ETA, ETB	Kontraktion und Synthese extrazellulärer Matrixproteine
Hepatozyten	ETA, ETB	Energiestoffwechsel, Endothelinsynthese und Metabolismus
Renovaskuläres System	ETA, ETB	Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, Zunahme des renovaskulären Widerstands, Inhibition der Natrium- und Wasser-Resorption
Neurone	ETA, ETB	Neuriten-Elongation, neuronale Stressantwort und Apoptose
Keratinocyten	ETA, ETB	Proliferation und Melaninsynthese
Adipozyten	ETA, ETB	Glucose- und Fettstoffwechsel
Endokrines System	ETA, ETB	Zunahme der Sekretion von Renin, Angiotensin II, Aldosteron, Vasopressin und Katecholaminen
Osteoblasten	ETA, ETB	Osteoblastenproliferation, -differenzierung, Stimulation der Aktivität und extrazellulären Knochenmatrixsynthese

2.3. Pathophysiologische Rolle der Endotheline

Kardiale Erkrankungen

Endotheline sind an der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt. So konnten erhöhte ET-1-Plasmakonzentrationen bei einer Herzinsuffizienz, akutem Myokardinfarkt, Angina pectoris und Vorhofflimmern nachgewiesen werden, die dabei einen Einfluss auf Inotropie, Chronotropie, koronare Durchblutung sowie Erregungsbildung und -ausbreitung haben. Der hohe ET-Spiegel induziert eine systemische und koronare Vasokonstriktion, was zu einer erhöhten Nachlast und einem verringerten Herzzeitvolumen führt und sich somit in einem negativ inotropen Effekt äußert. Bei einer kongestiven Herzinsuffizienz ist der Plasmaspiegel von big-ET-1 und ET-1 sogar zwei- bis dreimal höher als normal, wobei der Anstieg auf eine erhöhte kardiale und pulmonale Produktion statt auf eine verminderte Clearance zurückzuführen ist. Einige Studien deuten darauf hin, dass zumindest ein Teil des Anstiegs durch Angiotensin II vermittelt wird. Des Weiteren kommt es zu einer Heraufregulierung der ETA-Rezeptoren und einer Herabregulierung der ETB-Rezeptoren. ET-1 weist proarrhythmische Effekte bei einer Herzinsuffizienz auf, die sich in einer QT- und QRS-Verlängerung äußern. Neben seinen pro-arrhythmischen Effekten nimmt ET-1 eine zentrale Rolle beim ventrikulären Remodeling ein. Dabei stimuliert es direkt die Myokardhypertrophie sowie die Rekrutierung von Monozyten und die Freisetzung von Zytokinen, was die Fibrogenese fördert. Außerdem stimuliert ET-1 die kardialen Fibroblasten, welche extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronektin und Kollagen produzieren und so eine Myokardfibrose fördern. Nach einer Gefäßschädigung scheint ET-1 neben einer Vasokonstriktion und der Stimulation der vaskulären Zellproliferation auch für die vaskuläre Inflammation und Neointimabildung verantwortlich zu sein. So wird davon ausgegangen, dass eine Re-Stenose nach einer erfolgreichen perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) eine Folge der ET-1-vermittelten Proliferation und Kontraktion glatter Muskelzellen ist. Die Konzentration von ET-1 und big-ET-1 im Plasma korreliert bei Menschen mit einer dekompensierten Herzinsuffizienz, unabhängig von der Ursache, eng mit der Schwere der Symptome und den hämodynamischen Veränderungen. Ebenfalls korreliert die Überlebensrate von Patienten, die einen Herzinfarkt erlitten haben, nach einem Jahr stark mit der Plasmakonzentration von ET-1, die drei Tage nach dem Infarkt ermittelt wurde. Somit könnte es möglich sein, über die ET-1-Plasmakonzentration eine prognostische Aussage bei Patienten mit Herzversagen zu treffen (Miyachi et al. 1989, Stewart et al. 1991, McMurray et al. 1992, Omland et al. 1994, Tsutamoto et al. 1994, Xu et al. 1994, Zeiher et al. 1994, Kaski et al. 1995, Clavell et al. 1996, Hoffmann et al. 1998, Pieske et al. 1999, Burrell et al. 2000, Piacentini et al. 2000, Parker und Thiessen 2004, Anggrahini et al. 2009).

Arterielle Hypertonie

Da Endothelin eine starke vasokonstriktorische Potenz aufweist, wurde ihm bereits früh eine pathophysiologische Rolle bei der arteriellen Hypertonie zugeschrieben. In experimentellen Studien zeigte eine systemische Gabe von ET-1 einen Anstieg und eine Blockade des ET-Systems mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten eine Senkung des Blutdruckes. Außerdem wurde bei Patienten mit einem Hämangioendotheliom eine erhöhte ET-1 Plasmakonzentration mit Hypertonie beschrieben, die sich jedoch nach Entfernung des Tumors wieder im Normbereich stabilisierte. Dennoch ist die Plasmakonzentration bei den meisten Patienten mit essenzieller Hypertonie, vermutlich aufgrund der parakrinen oder autokrinen Sekretion, nicht oder nur gering erhöht. Allerdings nimmt die lokale ET-1-Konzentration in den Gefäßwänden bei einer Hypertonie zu. Abgesehen von seinen direkten vasokonstriktorisches Effekten, die durch die Kontraktion der glatten Muskelzellen im arteriellen System vermittelt werden, verstärkt ET-1 auch indirekt die vasokonstriktorisches Wirkung anderer neurohumoraler und endokriner Faktoren und kann die Entstehung einer essentiellen Hypertonie über diesen Mechanismus potenzieren. Beispielsweise induziert ET-1 in In-vitro-Modellen die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II und stimuliert die Synthese von Adrenalin und Aldosteron (Schiffrin und Thibault 1991, Yokokawa et al. 1991, Kaddoura et al. 1996, Barton et al. 1997, Lariviere und Lebel 2003, Barton und Yanagisawa 2008).

Pulmonale Erkrankungen

ET-1 hat eine starke bronchokonstriktorische Wirkung. Erhöhte ET-1-Spiegel konnten bei Patienten mit kryptogener, fibrosierender Alveolitis, Asthma bronchiale oder pulmonalarterieller Hypertonie nachgewiesen werden. An Asthma bronchiale leidende Patienten weisen einen erhöhten ET-1-Spiegel in der Flüssigkeit der Bronchiallavage auf, jedoch nicht im Plasma. Bei Patienten mit einer primären pulmonalen Hypertonie konnte ein bis zu sechsfach über der Norm liegender ET-1-Plasmaspiegel nachgewiesen werden. Es ist dabei davon auszugehen, dass entweder eine Störung der Eliminierung oder eine vermehrte Produktion zu diesen hohen ET-1-Spiegeln führt (Mattoli et al. 1991, Giaid et al. 1993, Kedzierski und Yanagisawa 2001).

Nach intravenöser Applikation von ET-1 kommt es zu einer dosisabhängigen Erhöhung des Atemwegswiderstandes, was teilweise auf eine verstärkte Thromboxan-Produktion mit anschließender Aktivierung der Thromboxanrezeptoren auf den glatten Muskelzellen des Bronchialsystems zurückgeführt wird. Darüber hinaus wirkt Endothelin für die Gefäßmuskelzellen in der Lunge als Wachstumsfaktor, führt zu einer Inflammation und ist an der Entstehung der pulmonalen Fibrosierung beteiligt (Schumacher et al. 1990, Glassberg et al. 1994, Hochar et al. 2000).

Niereninsuffizienz

In den Nieren wird ET-1 in vaskulären Endothelzellen und in den Epithelzellen der Sammelrohre gebildet. Beide ET-Rezeptoren sind sowohl in Nierengefäßen als auch in Epithelzellen nachgewiesen worden, wobei der ETB der vorherrschende Rezeptortyp ist. Das Nierengefäßsystem ist gegenüber den vasokonstriktorisches Effekten von ET-1 empfindlicher als jedes andere Gefäßsystem und ET-1 bewirkt hier insbesondere eine Verengung der afferenten sowie der efferenten Nierenarteriolen. Die systemische Verabreichung von ET-1 reduziert signifikant die renale Durchblutung, die glomeruläre Filtrationsrate und das Urinvolumen (Edwards et al. 1990, Kohan 1991, Terada et al. 1992, Kaasjager et al. 1997).

Bei einer Reihe renaler Krankheitsbilder wie dem akuten und chronischen Nierenversagen oder durch Pharmaka induzierten Nephropathien können erhöhte ET-1-Konzentrationen im Urin nachgewiesen werden. Besonders bei der diabetischen Nephropathie korreliert die Schwere der Erkrankung mit den im Plasma und Urin der Patienten erhöht vorliegenden ET-1-Konzentrationen. In-vitro-Studien zeigen, dass bei progressiven proteinurischen Erkrankungen große Mengen von ET-1 im Nierengewebe synthetisiert werden und im Interstitium akkumulieren. So führt die Inkubation proximaler Tubuluszellen mit Albumin, IgG oder Transferrin konzentrationsabhängig zu einer vermehrten ET-1-Synthese. Interstitielle Fibroblasten proliferieren und produzieren nach ihrer Aktivierung durch ET-1 extrazelluläre Matrix in Form von Kollagen (Typ I, III, IV) und Laminin. Vergleichbar mit der Situation in der Gefäßwand kommt es durch chemotaktische Aktivierung von Monozyten zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Beide Mechanismen können durch einen interstitiellen Umbau bis zur Fibrosierung führen (Rubanyi und Polokoff 1994, Benigni und Remuzzi 1996, Zoja et al. 1995, Hoher et al. 1997, Meli und Bruno 2001).

Atherosklerose

Ergebnisse aus experimentellen Studien und klinischen Untersuchungen legen eine Beteiligung des ET-1 an der Pathogenese der Atherosklerose nahe. So ist die ET-1-Konzentration in atherosklerotischen Plaques der Arterien erhöht. Dabei führt ET-1 nicht nur zu einer Vasokonstriktion, sondern induziert über die Aktivierung von Makrophagen und die Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren eine Entzündungsreaktion in der Gefäßwand. Im weiteren Verlauf kommt es unter anderem durch die mitogenen Effekte des ET-1 zu einer Proliferation der Fibroblasten. ET-1 steigert dabei nicht nur die Proliferation von Fibroblasten, sondern auch von glatten Muskelzellen der Media. Es stimuliert die Kollagenbiosynthese und aktiviert Thrombozyten. Aktivierte Thrombozyten fördern die Migration von glatten Muskelzellen und stimulieren ihrerseits die

Kollagenbiosynthese. Dieser komplexe Prozess führt über einen längeren Zeitraum zur Bildung herdförmiger Gewebeveränderungen, sogenannter atherosklerotischer Plaques, die für das mikroskopische Bild der Atherosklerose charakteristisch sind und zur progredienten Einengung des Gefäßlumens führen (Weissberg et al. 1990, Ohlstein et al. 1992, Shi et al. 1996, Ruetten et al. 1997, Hofman et al. 1998, Libby 2002, Hoeper et al. 2005, Böhm und Pernow 2007).

Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus korrelieren erhöhte ET-1-Konzentrationen im Plasma mit den Blutglukose-Werten. Weiterhin wurden beim gehäuft mit Diabetes mellitus Typ 2 vergesellschafteten metabolischen Syndrom mit Hyperinsulinämie hohe ET-1 Konzentrationen im Plasma nachgewiesen, die wahrscheinlich direkt durch Insulin verursacht werden. Experimentelle und klinische Befunde zeigten, dass es zu Veränderungen des Endothelinsystems vor allem in denjenigen Organen kommt, die von diabetischen Komplikationen betroffen sind. So könnte die beim Diabetes mellitus Typ 2 beobachtete vermehrte ET-1-Produktion über den vasokonstriktiven und mitogenen Effekt des ET-1 an der Pathogenese der Makroangiopathie beteiligt sein (Hu et al. 1993, Rubanyi und Polokoff 1994, Ferri et al. 1995, Perfetto et al. 1995, Ferri et al. 1996, Shin et al. 1996).

Subarachnoidalblutung und zerebrale Ischämie

Nach einer zerebralen Ischämie kommt es zu einer Zunahme der ET-1-Synthese und einer Hochregulation der Expression von ET-Rezeptoren. Die Wirkung von Endothelin auf zerebrale Gefäße äußert sich in einer potenten und lang anhaltenden Kontraktion, woraus eine entsprechende Reduktion des Blutflusses resultiert. Zusätzlich kann ET-1 die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen und eine neuronale Schädigung induzieren. Patienten mit einer Subarachnoidalblutung weisen im Verlauf erhöhte big-ET-1- und ET-1-Spiegel auf. So wird ET-1 als Hauptvermittler von Vasospasmen nach einer Subarachnoidalblutung angesehen, wobei seine Plasmakonzentration mit dem Ausmaß des Vasospasmus korreliert. Des Weiteren konnte in experimentellen Studien bei Ratten und Hunden mit einem experimentell erzeugten ischämischen Hirninfarkt oder einer Subarachnoidalblutung, eine erhöhte ET-1-Immunreaktivität im Gefäßsystem und in der Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden (Suzuki et al. 1992, Clozel et al. 1993, Barone et al. 1994, Roux et al. 1995, Shigeno et al. 1995, Juvela 2000, Matsuo et al. 2001, Petrov und Rafols 2001).

Karzinogenese

Endotheline sind am Wachstum und an der Progression vieler Tumortypen beteiligt. Diese umfassen Prostata-, Eierstock-, Nieren-, Lungen-, Kolorektal-, Cervix-, Brust-, Blasen- und Endometriumkarzinome, Osteosarkome, Melanome und andere. Dabei trägt die Hochregulation der ET-Rezeptoren zur Zellproliferation, Apoptoseresistenz, Angiogenese, Migration, Invasion und Metastasierung bei, wobei sich das Expressionsmuster der ET-Rezeptor-Subtypen zwischen den Krebsarten unterscheidet (siehe Tabelle 3). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Höhe des ET-1-Spiegels im Plasma und die der ET-Rezeptor-Expression mit der Prognose korreliert. ET-1 ist in der Lage, die Signalwege unterschiedlicher Kinasen zu regulieren, was zu einer vermehrten Zellproliferation, Zelladhärenz, Invasion, epithelial-mesenchymalen Transition, Angiogenese und Zellmotilität führt. Endotheline modulieren auch die Differenzierung und Aktivierung von tumorinfiltrierenden Immunzellen. Durch die Sekretion von bestimmten Zytokinen durch die neoplastischen Zellen wie IL-1, TNF- α und TGF- β , welche ihrerseits wieder die ET-1-Produktion stimulieren, entsteht so eine positive Rückkopplungsschleife, die das Wachstum von Tumoren weiter beschleunigen kann (Bhalla et al. 2009, Khimji und Rockey 2010, Rosano et al. 2013, Davenport et al. 2016).

Tabelle 3: Expression von ET-Rezeptoren in humanen Malignomen (Nelson et al. 2003a, Bhalla et al. 2009, Rosano et al. 2013).

Tumorart	ET-Rezeptoren
Prostatakarzinom	ETA-Rezeptor
Ovarialkarzinom	ETA-Rezeptor
Colonkarzinom	ETA-Rezeptor
Cervixkarzinom	ETA-Rezeptor
Mammakarzinom	ETA- und ETB-Rezeptor
Kaposi-Sarkom	ETA- und ETB-Rezeptor
Lungenkarzinom	ETA- und ETB-Rezeptor
Nierenkarzinom	ETA- und ETB-Rezeptor
Glioblastom	ETA- und ETB-Rezeptor
Magenkarzinom	ETA- und ETB-Rezeptor
Blasenkarzinom	ETA- und ETB-Rezeptor
Meningeom	ETA- und ETB-Rezeptor
Osteosarkome	ETA- und ETB-Rezeptor
Melanom	ETB-Rezeptor
Vulvakarzinom	ETB-Rezeptor
Hepatozelluläres Karzinom	ETB-Rezeptor

2.4. Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

Die ubiquitäre Verteilung der Endothelin-Rezeptoren im Organismus und die Beteiligung von ET-1 an der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen macht die Entwicklung von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten interessant (Noll et al. 1996).

Endothelin-Rezeptor-Antagonisten werden pharmakologisch hinsichtlich ihrer Rezeptorspezifität in selektive ETA- und ETB-Rezeptor-Antagonisten sowie gemischte ETA-/ETB-Rezeptor-Antagonisten eingeteilt. Man unterscheidet peptidische von nichtpeptidischen Substanzen. Die ersten selektiven Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, die auch noch heute noch für pharmakologische Studien genutzt werden, waren das cyclische Pentapeptid BQ123, ein selektiver ETA-Rezeptor-Antagonist, und das acyclische Tripeptid BQ788, ein selektiver ETB-Rezeptor-Antagonist. Obwohl die beiden Peptide entscheidend dazu beigetragen haben, die Physiologie der Endotheline und der beiden Rezeptor-Subtypen zu verstehen, fanden sie jedoch, aufgrund der hohen Herstellungskosten und der Tatsache, dass sie parenteral appliziert werden müssen, keinen Eingang in größere klinische Studien (Ishikawa et al. 1992, Ishikawa et al. 1994, Dasgupta et al. 2002).

Bosentan war der erste oral bioverfügbare Antagonist. Es ist ein ETA-/ETB-Rezeptor-Antagonist, der 2002 zur Verbesserung der körperlichen Belastbarkeit und der hämodynamischen Symptome bei Patienten mit pulmonalerarterieller Hypertonie zugelassen wurde. In experimentellen Studien verminderte Bosentan die pulmonalerarteriellen Entzündungsreaktionen, reduzierte die erhöhte Permeabilität pulmonaler Gefäße und schützte vor der Entstehung einer Fibrose. Bei Ratten mit pulmonaler Hypertonie verringerten sich der pulmonalerarterielle Druck sowie die vaskuläre und rechtsventrikuläre Hypertrophie, ohne dass eine systemische Vasodilatation auftrat. Auch die hämodynamischen Parameter im Lungenkreislauf und das Herzzeitvolumen verbesserten sich (Chen et al. 1995). Bosentan wird oral verabreicht. Es hat eine Bioverfügbarkeit von 50% und eine Eliminationshalbwertszeit von 5 Stunden, weswegen die Einnahme zweimal täglich erfolgen muss. Wegen den dosisabhängigen, schweren Nebenwirkungen erfolgt die Therapie nur unter strenger ärztlicher Kontrolle. So müssen aufgrund einer ausgeprägten Hepatotoxizität regelmäßig die Plasmaspiegel der Aminotransferasen kontrolliert werden. Weitere auftretende unerwünschte Wirkungen sind Kopfschmerzen, Beinödeme, Flush und Hämoglobin-Abfall bis hin zu Anämien. Außerdem darf Bosentan aufgrund seiner potenziellen Teratogenität bei Frauen im gebärfähigen Alter nur verwendet werden, wenn zuverlässige Verhütungsmethoden angewendet werden (Sütsch et al. 1998, Rubin et al. 2002, Dingemanse und van Giersbergen 2004, McLaughlin et al. 2005).

Macitentan ist ein weiterer, seit 2013 zugelassener ETA/ETB-Rezeptor-Antagonist, der im Vergleich zum Bosentan lipophiler und besser gewebeängig ist. Im Tierversuch mit Ratten, die an pulmonalerarterieller Hypertonie litten, konnte Macitentan sowohl den Anstieg des pulmonalen Blutdrucks, als auch eine Hypertrophie des rechten Ventrikels verhindern. Auch eine Verbesserung der Überlebensrate konnte verzeichnet werden. Die Ergebnisse an diabetischen Ratten zeigten einen Blutdruckabfall und eine Verminderung der Proteinurie und deuten auf eine Schutzfunktion von Macitentan vor diabetischen Endorganschäden hin. In klinischen Studien konnte gegenüber einer Therapie mit Placebo ein deutlich verringertes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko sowie ein signifikant vermindertes Risiko für eine Hospitalisierung der Patienten nachgewiesen werden. Auch zeigten sich Hinweise auf gefäßwandprotektive Eigenschaften (Iglarz et al. 2008, Pulido et al. 2013).

Sitaxentan ist ein hochselektiver ETA-Rezeptor-Antagonist, der eine hohe orale Bioverfügbarkeit von 70% bis 100% und eine lange Halbwertszeit von 5 bis 7 Stunden aufweist. Er wurde 2006 auf dem deutschen Markt unter den Namen Thelin® zur Therapie der pulmonalerarteriellen Hypertonie zugelassen, jedoch 2010 wegen des Auftretens schwerwiegender Leberschädigungen weltweit wieder vom Markt genommen (Barst 2007, Löschmann und Biedermann 2010).

Ambrisentan ist ein weiterer selektiver ETA-Rezeptor-Antagonist, der zur einmal täglichen peroralen Gabe für Patienten mit pulmonalerarterieller Hypertonie der WHO-Stadien II und III, unter dem Handelsnamen Volibris®, in der Europäischen Union und in der Schweiz zugelassen wurde. Das Nebenwirkungsprofil von Ambrisentan ist günstiger als das von Bosentan (Vatter und Seifert 2006, Rivera-Lebron und Risbano 2017).

Atrasentan ist ein ETA-Rezeptor-Antagonist, der aktuell in klinischen Studien zur Behandlung der diabetischen Nephropathie sowie der Albuminurie bei Typ-2-Diabetikern und zur Krebstherapie bei Prostatakarzinom-Patienten getestet wird. Wie die anderen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wurde auch Atrasentan zur Behandlung kardiopulmonaler Erkrankungen entwickelt. In einer Studie zur kongestiven Herzinsuffizienz führte die orale Einnahme von Atrasentan zu einer Senkung des pulmonalerarteriellen Druckes und des pulmonalen Gefäßwiderstandes. Gleichzeitig erhöhte sich die kardiale Auswurfsleistung. Bei Patienten mit Prostatakarzinom konnte ein Anstieg an Tumormarkern im Serum, wie Prostata-spezifisches Antigen, Alkalische Phosphatase, N-Telopeptid, C-Telopeptid, Desoxypyridinolin und Lactatdehydrogenase durch Einsatz von Atrasentan deutlich gemildert werden. Derzeit werden eine Phase-III-Studie mit der Kombination von Docetaxel/Atrasentan bei metastasierendem, hormonrefraktärem Prostatakarzinom und eine Phase-II-Studie bei

metastasierendem kastrationsresistentem Prostatakarzinom durchgeführt. Untersuchungen zur Behandlung von weiteren Tumorerkrankungen wie Ovarialkarzinomen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Mammakarzinomen und Hirntumoren laufen ebenfalls bereits. Typische Nebenwirkungen von Atrasentan sind Rhinitiden, Nasenkongestion, Cephalgie, periphere Ödeme, Nausea und Dyspnoe; diese Symptome sind überwiegend durch die vasodilatatorischen Eigenschaften des Atrasentans erklärbar (Borgeson et al. 1998, Samara et al. 2001, Nelson et al. 2008, Galsky und Vogelzang 2010, Wang und Dashwood 2011).

Avosentan ist ein weiterer selektiver ETA-Antagonist. Die Substanz konnte in Versuchen an Tieren mit Diabetes mellitus das Fortschreiten der Nephropathie und der Atherosklerose verlangsamen. Ebenso konnten in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelblinden Phase-III-Studie an Diabetes-Typ-II-Patienten auch in vivo positive Effekte wie eine signifikante Reduktion der Proteinurie gezeigt werden, allerdings führte die Substanz zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie einer Flüssigkeitsüberladung mit daraus folgendem Lungenödem oder einer Herzinsuffizienz (Mann et al. 2010, Watson et al. 2010).

Zibotentan ist ein sehr selektiver ETA-Antagonist. Ergebnisse aus In-vitro-Studien und Tierversuchen zeigten, dass Zibotentan die Angiogenese und das Tumorwachstum hemmen kann und eine Kombinationstherapie von Zibotentan mit Aromatase-Inhibitoren (Anastrozol und Fulvestrant) synergistische Effekte in der Behandlung von Brustkrebs aufweist. Auch der kombinierte Einsatz von Zibotentan mit Atrasentan hatte in vorklinischen Studien bei Ovarialkarzinomen einen positiven Effekt. Weiterhin konnte in einer klinischen Phase-II-Studie, in der die Sicherheit und Wirksamkeit von Zibotentan bei Patienten mit metastasierendem kastrationsresistentem Prostatakarzinom untersucht wurde, ein Gesamtüberlebensvorteil der mit Zibotentan behandelten Patienten im Vergleich zur Placebogruppe nachgewiesen werden. Zurzeit wird eine Phase-III-Studie durchgeführt, die dieses Ergebnis verifizieren soll (Warren und Liu 2008, James et al. 2009, Smollich et al. 2010, Wang und Dashwood 2011).

2.5. Antikörper

Antikörper sind Glykoproteine die den Hauptfaktor der adaptiven humoralen Immunantwort von Wirbeltieren bilden. Sie können membranständig als Teil des B-Zell Rezeptorkomplexes vorkommen sowie von B-Zellen nach ihrer Aktivierung als lösliche Antikörper in Körperflüssigkeiten sezerniert werden. Da lösliche Antikörper im Blut bei der elektrophoretischen Auftrennung der Plasmaproteine in der γ -Globulinfraktion nachweisbar sind, werden sie auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Man differenziert zwischen fünf Antikörperklassen, die sich wegen der Unterschiede in der Aminosäuresequenz der

einzelnen Abschnitte, im Kohlenhydratgehalt, in der Molekularmasse, im Sedimentationskoeffizienten und in den biochemischen Funktionen durch die Immunelektrophorese auftrennen lassen. Sie werden als IgG, IgA, IgM, IgD und IgE bezeichnet (Löffler et al. 2007, Neumann 2008, Rink et al. 2012).

Trotz struktureller Unterschiede gehen die Antikörper der einzelnen Klassen auf ein gemeinsames Grundmodell aus vier Untereinheiten, zwei schweren Polypeptidketten (heavy oder H), mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa, sowie zwei leichten Ketten (light oder L), mit einem Molekulargewicht von etwa 25 kDa, zurück. Die Untereinheiten lagern sich über Disulfidbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zusammen und bilden so eine Y-förmige Struktur. Schwere und leichte Polypeptidketten lassen sich in einzelne ca. 100 Å große globuläre Domänen (Immunglobulindomänen) unterteilen, die durch intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert werden. Die schweren und leichten Antikörperketten besitzen je eine Domäne, die als variable (V) Region (VH bzw. VL) bezeichnet wird. Im Anschluss an die variablen Domänen folgen die in ihrer Aminosäuresequenz nicht variablen bzw. konstanten Antikörperdomänen. Jede leichte Kette besitzt eine konstante Domäne. Alle schweren Ketten besitzen mit Ausnahme der schweren Ketten der IgM- und der IgE-Antikörper drei konstante Domänen. Durch die pflanzliche Protease Papain lässt sich ein Antikörper in ein leicht kristallisierbares Fc- (engl.: crystallizable fragment) und zwei identische Antigen-bindende Fab-Fragmente (engl.: antigen binding fragment) spalten. So lassen sich die Fab-Fragmente und das Fc-Fragment sowohl strukturell als auch in ihrer Funktion unterscheiden. Die N-terminalen Fab-Fragmente setzen sich je aus einer variablen und einer konstanten Domäne zusammen und sind für die spezifische Antigenbindung verantwortlich. Das C-terminale Fc-Fragment, welches aus den konstanten Domänen der schweren Ketten besteht, vermittelt die Effektorfunktionen, indem es je nach Antikörperklasse das Komplementsystem aktiviert, die Phagocytose vermittelt oder die Degranulierung der Mastzellen aktiviert. Die beiden Fab-Fragmente sind über eine flexible Gelenkregion (hinge-Region) mit dem Fc-Fragment verbunden, die dem Antikörper eine große Flexibilität bei der Bindung von Antigenen verleiht (Dübel et al. 2004, Rink et al. 2012).

2.5.1. Herstellung poly- und monoklonaler Antikörper

Ein Antigen weist gewöhnlich mehrere unterschiedliche Antikörperbindungsstellen, so genannte Epitope, auf. Ein Immunglobulin wiederum erkennt und bindet nur ein Epitop. Bei Kontakt mit einem Antigen werden unterschiedliche Plasmazellen (differenzierte B-Lymphozyten) aktiviert, die für ein jeweils spezifisches Epitop einen Antikörper bilden. So entsteht eine Mischpopulation von Antikörpern, die sich in ihren Epitop-Spezifitäten unterscheiden, aber die gleiche Antigenspezifität besitzen. Eine solche Mischpopulation in aufgereinigter Form wird als „polyklonaler Antikörper“ bezeichnet, die unaufgereinigte

Variante als „polyklonales Antiserum“. Während polyklonale Antikörper von unterschiedlichen B-Zell-Klonen produziert werden, werden monoklonale Antikörper von ein und demselben B-Zell-Klon gebildet. Sie sind daher auch nur gegen ein einzelnes spezifisches Epitop gerichtet (Dübel et al. 2004, Hahn et al. 2005).

Polyklonale Antiseren werden häufig aus Kaninchen, Mäusen, Ratten, Hühnern, Schafen oder anderen Spezies gewonnen, wobei sich umso mehr an Antikörper-haltigem Serum gewinnen lässt, je größer das Tier ist. Allerdings muss bei größeren Tieren auch entsprechend mehr Antigen zur Immunisierung eingesetzt werden. Der Grad der Immunogenität des Antigens ist entscheidend für die für die Immunisierung erforderliche Antigenmenge. Je höher dieser ist, desto geringer ist die benötigte Menge. Die Immunogenität eines Antigens ist abhängig von dessen Beschaffenheit. So sind Peptide weniger stark immunogen als Proteine. Bei der Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgt zunächst die Primärimmunisierung des gewählten Versuchstieres. Dabei wird das spezifische Antigen in möglichst reiner Form z.B. subcutan appliziert. Um die Immunreaktion zu verstärken und zu verlängern, appliziert man zusammen mit dem Antigen ein geeignetes Adjuvans, z.B. Freund'sches Adjuvans. Im weiteren Verlauf, in Abhängigkeit von den sich entwickelnden Antikörpertitern in dem Versuchstier, erfolgen ca. 2 bis 3 Booster-Immunisierungen, durch die die im Zuge der Primärimmunisierung generierten Gedächtniszellen aktiviert werden. Einige Wochen nach der letzten Immunisierung wird dem Tier Blut entnommen und das die Antikörper enthaltende Serum gewonnen. Das so entstandene polyklonale Antiserum kann weiter aufgereinigt werden, um eine reine Immunglobulin-Fraktion zu erhalten (Löffler et al. 2007, Luttmann et al. 2009).

Das Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit Hilfe der Hybridom-Technik, wurde 1975 von Georges Köhler und Cesar Milstein entwickelt (siehe Abbildung 3). Dabei werden normale antikörpersezernierende Plasmazellen, die terminal differenziert sind und nicht mehr die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen, mit malignen Plasmazellen, den Myelomzellen, die die Fähigkeit zur Antikörperproduktion verloren haben, sich jedoch unbegrenzt teilen können, fusioniert. Die so entstehenden Hybridomzellen besitzen sowohl die Fähigkeit der Plasmazellen, spezifische Antikörper zu produzieren, als auch die Immortalität der Myelomzellen. Um monoklonale Antikörper herzustellen, muss man zunächst ein Versuchstier, ähnlich wie bei der Herstellung polyklonaler Antikörper, gegen das gewünschte Antigen immunisieren. Dazu injiziert man mehrmals, z.B. einer Maus oder einem Kaninchen, (mit oder ohne Adjuvans) das betreffende Antigen, gegen welches die Antikörper gebildet werden sollen. Im weiteren Verlauf werden zur Kontrolle der Immunantwort in regelmäßigen Abständen Antikörpertiter z.B. per ELISA bestimmt. Bei

ausreichend hohen Titern wird dem Versuchstier die Milz entnommen, um daraus die antikörpersezernierenden Plasmazellen zu isolieren. Die isolierten Plasmazellen werden unter Zugabe von Polyethylenglycol oder mittels eines elektrischen Feldes, was durch eine Senkung der negativen Oberflächenladungen der Zellen eine Verschmelzung ermöglicht, mit Myelomzellen fusioniert. Im Anschluss an die Fusion durchlaufen die Zellen eine Selektionsphase durch eine Kultivierung im sogenannten HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)-Medium. Aminopterin hemmt den normalen Weg der Purin- und Pyrimidin-Biosynthese, so dass nur noch Zellen teilungsfähig sind, die über alternative Stoffwechselwege, mittels des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT), aus Hypoxanthin und Thymidin die entsprechenden Nukleotide produzieren können. Myelomzellen besitzen im Gegensatz zu Plasmazellen keine HGPRT und sterben deshalb ab. Plasmazellen haben eine limitierte Lebensspanne und sterben deshalb auch nach einer gewissen Zeit ab. Deswegen sind nur fusionierte Zellen über einen längeren Zeitraum im HAT-Medium lebensfähig. Aus den so gewonnenen Hybridomzellen können schließlich die Zellklone mittels einer Nachweis-Methode, z.B. ELISA, detektiert werden die den Antikörper in der gewünschten Spezifität produzieren. Der oder die schließlich auserwählten Klone werden in der Folge in Zellkultur in vitro weitervermehrt, wobei die Hybridomzellen ständig Antikörper produzieren und in das Kulturmedium sezernieren. Der Hybridomüberstand enthält den gewünschten Antikörper, der in ungereinigter oder in aufgereinigter Form verwendet werden kann (Löffler et al. 2007, Luttmann et al. 2009, Rink et al. 2012). Die jeweiligen Vor- und Nachteile von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Jeweilige Vor- und Nachteile von poly- oder monoklonalen Antikörpern

	Vorteile	Nachteile
Polyklonale Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • preisgünstig • unkomplizierte und schnelle Gewinnung • große Serummengen • unterschiedliche Epitopspezifität 	<ul style="list-style-type: none"> • Chargenunterschiede • Verfügbarkeit zeitlich begrenzt • ständige Qualitätskontrollen notwendig • große Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen • ungewollte Antikörper im Antiserum enthalten
Monoklonale Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • unlimitierte Verfügbarkeit • gleichbleibende Qualität • wenig Begleitsubstanzen im Serum • geringe Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen • molekular identische Antikörper 	<ul style="list-style-type: none"> • teure und aufwendige Herstellung • Spezifität nur für ein Epitop

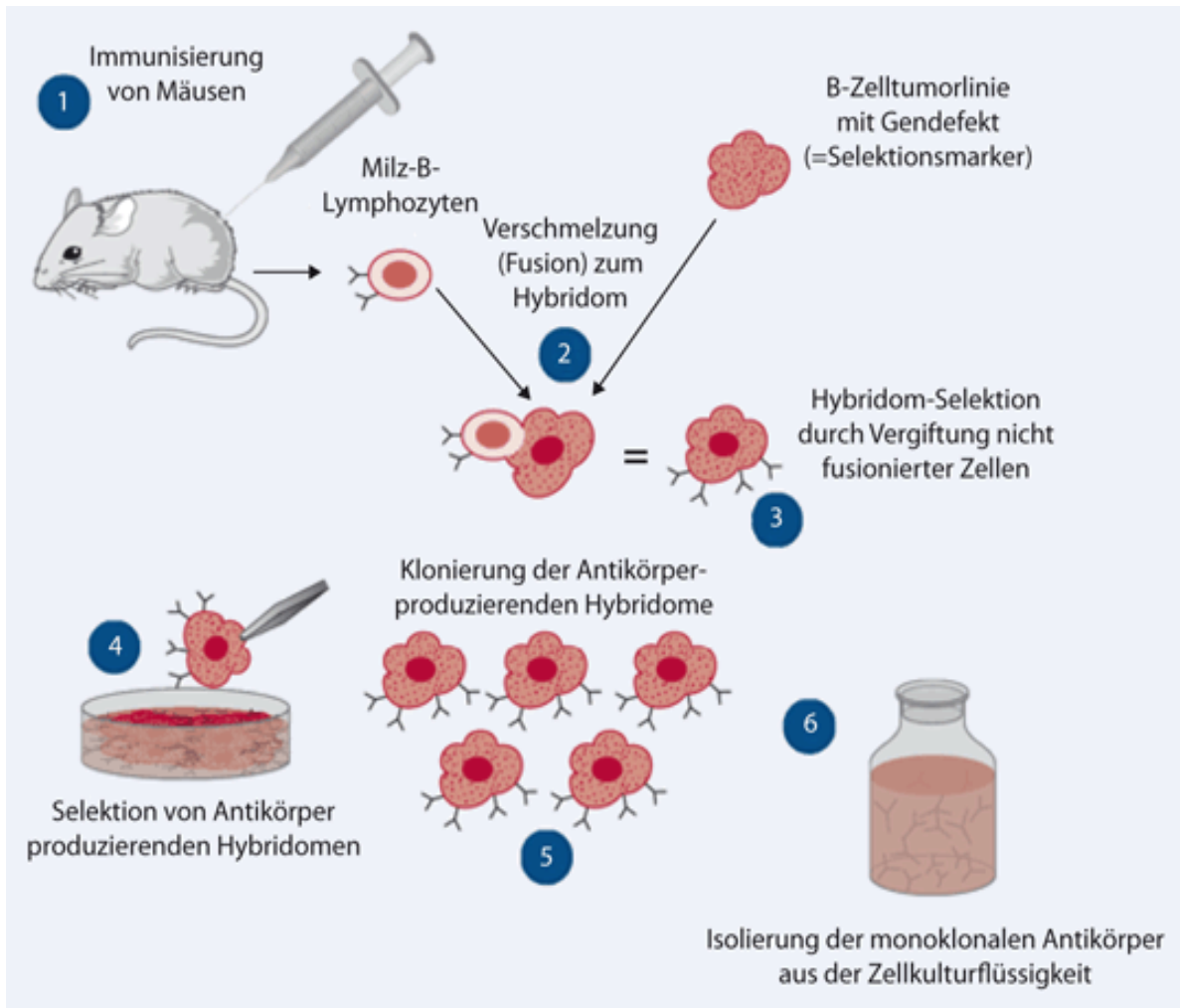


Abbildung 3: Produktion von monoklonalen Antikörpern. Um Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zu gewinnen, wird zunächst ein Tier mit diesem Antigen immunisiert, um die Anzahl antigenspezifischer B-Lymphozyten zu erhöhen (1). Diese B-Lymphozyten werden anschließend mit B-Zell-Lymphom-Zellen fusioniert, ein Hybridom entsteht (2). Durch Selektion in bestimmten Kulturmedien sterben alle unfusionierten B- und Lymphom-Zellen ab (3). Anschließend werden aus allen Hybridomzellen diejenigen selektioniert, die überhaupt Antikörper produzieren (4). Diese werden dann einzeln in Kulturschalen ausgesät. Nachdem aus diesen einzelnen Zellen wieder Zellklone herangewachsen sind, werden die, die den passenden Antikörper produzieren, ausgewählt (5), expandiert und können dann zur Produktion unbegrenzter Mengen des monoklonalen Antikörpers eingesetzt werden (6) (Frey und Kamradt 2011).

3. Zielstellung

Aus der Literatur ist bekannt, dass der ETA-Rezeptor von zahlreichen Tumoren überexprimiert wird, so dass er eine interessante Zielstruktur für die Tumor-Diagnostik und -Therapie darstellen könnte. Eine notwendige Voraussetzung hierfür ist jedoch der exakte Nachweis der Expressionsintensität des Rezeptors in den jeweiligen Tumoren. Diese kann sehr gut mittels Immunhistochemie in der routinemäßigen histopathologischen Diagnostik erfolgen. Hierfür standen allerdings bisher größtenteils nur polyklonale Antikörper zur Verfügung, welche, bedingt durch ihre Herstellungsweise, nur begrenzt erhältlich sind, deswegen in ihrer Qualität erheblichen Schwankungen unterliegen können und im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern häufig auch zu unspezifischen Färbungen führen. Daher wurde vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena in Zusammenarbeit mit der Firma Epitomics, Burlingame, CA, USA, der monoklonale Antikörper UMB-8 generiert, der gegen das C-terminale Ende des humanen ETA gerichtet ist. Da sich das C-terminale Ende des humanen Rezeptors von dem des ETA-Rezeptors der Ratte und der Maus nur in 3 Aminosäuren unterscheidet, waren Kreuzreaktionen erwartet worden und auch beabsichtigt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nun eine detaillierte Charakterisierung der Spezifität des UMB-8. Hierfür wurden immunzytochemische Untersuchungen an mit dem ETA transfizierten HEK-293-Zellen, Western-Blot-Analysen an mit dem ETA transfizierten HEK-293-Zellen und an Mausgeweben sowie immunhistochemische Färbungen an normalen Ratten-, Maus- und Humangeweben sowie an einer großen Serie von humanen Tumoren durchgeführt. Zu weiteren Überprüfung der Spezifität des UMB-8 erfolgten bei allen eingesetzten Methoden zusätzliche Peptidneutralisationen.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Untersuchungsmaterial

4.1.1.1. Zelllinien

HEK-293: humane embryonale Nierenzelllinie (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland).

HEK-293-ETA: stabil mit dem humanen ETA-Rezeptor transfizierte HEK-293-Zellen.

4.1.1.2. Mausgewebe für die Western-Blot-Analysen

Von insgesamt 6 männlichen 60 Tage alten C57BL/6J-Mäusen wurden Gehirn, Rückenmark, Herz, Lunge, Niere, Milz und Colon entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

4.1.1.3. Paraffinblöcke für die Immunhistochemie

Für die durchgeführten immunhistochemischen Versuche wurden sowohl menschliche Tumorgewebe und menschliche Nicht-Tumorgewebe als auch Maus- und Rattenorgane verwendet, die in Formalin fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet worden waren. Das menschliche Material wurde aus den Archiven der Institute für Pathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald und dem Zentralklinikum Bad Berka zur Verfügung gestellt. Die Mausorgane stammten von männlichen 60 bis 90 Tage alten C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und die Rattenorgane von männlichen 60 bis 90 Tage alten HAN:Wist-Ratten aus der Zucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena. Die Organe waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und für eine spätere Verwendung archiviert worden. Aus den Paraffinblöcken wurden mittels eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht, bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert wurden.

Insgesamt standen 210 menschliche Tumorpräparate von folgenden Tumorentitäten zur Verfügung: Glioblastome (n = 20), GH-produzierende Hypophysenadenome (n = 7), Schilddrüsen-Karzinome (n = 3), Lungentumore (n = 15; davon kleinzellige Bronchial-Karzinome [n = 5], Adenokarzinome [n = 5], Plattenepithelkarzinome [n = 5]), Tumore des Magen-Darm-Traktes (n = 16; davon Gastrointestinale Stromatumore [n = 4], diffuse Magenkarzinome [n = 6], Magenkarzinome vom intestinalen Typ [n = 6]), Hepatozelluläre Karzinome (n = 5), Adenokarzinome des Pankreas (n = 10), klarzellige Nierenkarzinome (n =

10), Phäochromozytome (n = 10), Neuroendokrine Tumore (n = 24), Harnblasenkarzinome (n = 7), Prostatakarzinome (n = 15), Mammakarzinome (n = 7), Cervixkarzinome (n = 6), Ovarialkarzinome (n = 20), Hämangiome (n = 2), Sarkome (n = 35; davon Angiosarkome [n = 15], Liposarkome [n = 6], Rhabdomyosarkome [n = 3], Leiomyosarkome [n = 4], pleomorphe Sarkome [n = 2], Osteosarkome [n = 4]).

Zahlreiche Tumorpräparate enthielten angrenzendes Normalgewebe, welches ebenfalls ausgewertet wurde. Zusätzlich wurden Präparate von folgenden Normalgeweben untersucht: Cortex (n = 3), Herz (n = 3), Gewebe des Magen-Darm-Traktes (n = 30; davon Duodenum [n = 6]; Jejunum [n = 3], Ileum [n = 3], Colon ascendens [n = 3], Colon transversum [n = 3], Colon descendens [n = 3], Colon sigmoideum [n = 3], Rektum [n = 6]), Leber (n = 6), Gallenblase (n = 5), Pankreas (n = 7), Niere (n = 6), Mamma (n = 3), Cervix (n = 4), Corpus uteri (n = 1), Prostata (n = 6), Thymus (n = 6), Lymphknoten (n = 6), Milz (n = 6), Tonsille (n = 6) und Placenta (n = 6).

Von der Ratte und von der Maus wurden folgende Organe gefärbt (jeweils n = 6): Gehirn, Speicheldrüsen (Glandula submandibularis/sublingualis; Parotis), Harder'sche Tränendrüsen, Thymus, Lunge, Herz, Leber, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Milz, Lymphknoten, Darm (Duodenum), Samenblasen, Hoden.

4.1.2. Verwendete Substanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.1.2.1. Substanzen für die Immunzytochemie

- | | |
|---|---|
| • DePeX | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| • Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| • DMEM High Glucose (4,5 g/l) | PAA, Pasching, Österreich |
| • Dulbecco's PBS | PAA, Pasching, Österreich |
| • Fluoromount-G | SouthernBiotech, Birmingham, England |
| • G418-Sulfat-Lösung (50 mg/ml), Geneticin® | PAA, Pasching, Österreich |
| • L-Glutamin (200 mM) | PAA, Pasching, Österreich |
| • Lipofectamin 2000® | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| • Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat | PAA, Pasching, Österreich |
| • Normales Ziegenserum | PAA, Pasching, Österreich |

- Paraformaldehyd Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) PAA, Pasching, Österreich
- Penicillin/Streptomycin-Lösung PAA, Pasching, Österreich
- Pikrinsäure Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Poly-L-Lysin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Thiomersal AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- Triton® X-100 Ferak Berlin, Berlin, Deutschland
- Trypsin-EDTA 0,05% / 0,02% in PBS PAA, Pasching, Österreich

4.1.2.2. Substanzen für die Western-Blot-Analysen

- Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung 30% Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ammoniumpersulfat AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Bromphenolblau Bio-Rad, München, Deutschland
- Complete-mini® EDTA-free Roche, Mannheim, Deutschland
- Dithiotreitol Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- EDTA Roche, Mannheim, Deutschland
- Glycin Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Igepal Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Luminol Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Molekulargewichtsmarker (Prestained PageRuler) Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
- Natrium-Desoxycholat Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- p-Cumarsäure Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Pepstatin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- PhosSTOP® Roche, Mannheim, Deutschland
- Rinderserumalbumin (RSA) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Roti®-PVDF-Membran Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- SDS-Lösung 20% Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- TEMED Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

- TRIS-Hydrochlorid Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Tween®20 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Wasserstoffperoxid 30% Merck, Darmstadt, Deutschland
- WGA-Beads - Lectin, immobilisiert auf Agarose CL-4B von Triticum vulgaris Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

4.1.2.3. Substanzen für die Immunhistochemie

- AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol) BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA
- Ammoniak Merck, Darmstadt, Deutschland
- Citrat-Puffer-Bestandteile Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- DABCO Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol Nordbrand GmbH, Nordhausen, Deutschland
- Glycerin Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Mayer's Hämatoxylin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Methanol Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Mowiol 4-88 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- PBS-Puffersalze Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Rinderserumalbumin (RSA) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- TRIS Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- VECTASTAIN® Elite ABC Kit Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA
- Xylol Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

4.1.2.4. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

- Blotkammer Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad, München, Deutschland
- Blot-Papier Bio-Rad, München, Deutschland
- Brutschrank HERAccl® 240 Heraeus, Hanau, Deutschland
- CO₂ Inkubator Heracell 150i Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Deckgläser Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
- Entwicklungsmaschine AGFA Curix 60 Agfa-Gevaert AG, Morstel, Belgien

• Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
• Filmkassette Amersham Hypercassette™	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
• Fuji SuperRX Safelight Glass 13x18 (medizinischer Röntgenfilm)	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
• Laboklav	SHP Steriltechnik, Magdeburg, Deutschland
• Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
• Leica Jung-Histokinette 2000	Leica, Solms, Deutschland
• LSM 510 META Laser-Scanning-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
• Magnetrührer	Schott Instruments GmbH, Mainz, Deutschland
• Mikroskop Axio Imager A1	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
• Mikroskop Motic® AE20	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
• Mikrowelle CB 1271	Bomann, Kempen, Deutschland
• Milli Q Advantage A10	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
• Multiwell-Kulturplatte	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
• Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld, Deutschland
• Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
• Olympus-DP-70-Kamera-System	Olympus America Inc., Center Valley, Pennsylvania, USA
• Paraffin-Gieß-Automat EG 1110	Leica, Solms, Deutschland
• Pasteurpipetten	Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland
• Petrischalen Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
• pH-Labormessgerät pH 211	Hanna Instruments, Kehl, Deutschland
• Proteingelkammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
• Rotationsmikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf, Deutschland

• SafeSeal Reagiergefäße 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
• Schüttelgerät Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
• Schüttelwasserbad SW27	Julabo, Seelbach, Deutschland
• Sequenza [®] -Färbesystem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
• Serological Pipette 5 ml / 10 ml / 25 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
• Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
• Sterilium [®]	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
• Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• Ultraschall-Homogenisator Sonifier 450	Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
• Ultraschallstab	Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
• Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
• Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
• Zellkulturflaschen 75 cm ² , 250 ml	SPL Life Sciences, Pocheon-si, Südkorea
• Zellkulturplatten 24 Well	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
• Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg Deutschland
• Zentrifuge Biofuge 28RS	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

4.1.3. Lösungen und Standardpuffer

4.1.3.1. Lösungen und Standardpuffer für die Immunzytochemie

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) plus G418

DMEM-Basismedium mit 4,5 g/l Glucose),
1% L-Glutamin,
10% Fötale Kälberserum (FKS),
1% Penicillin / Streptomycin,
0,4 g/l Geneticindisulfatlösung (G418).

Geneticindisulfat (G418)-Stammlösung

400 µg Geneticinsulfat in 1 ml sterilem aqua bidest. lösen.

Phosphat-Puffer (PBS) 0,1 M, pH 7,4

13,7 g Dinatriumhydrogenphosphat,
3,2 g Natriumdihydrogenphosphat und
0,1% Triton X-100
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Poly-L-Lysin-Stammlösung

1 mg Poly-L-Lysin
in 1 ml aqua bidest. lösen.

Trypsin-Lösung:

0,05% Trypsin und
0,02% EDTA
mit PBS auf 100 ml auffüllen.

Zamboni-Fixierlösung

350 ml gesättigte Pikrinsäure und
80 g Paraformaldehyd
mit Phosphatpuffer auf 2 l auffüllen.

4.1.3.2. Lösungen und Standardpuffer für die Western-Blot-Analysen

Blotpuffer (1x)

3,03 g Tris,
11,25 g Glycin,
100 ml 10% Methanol
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Elektrophoresepuffer (10x)

30,3 g Tris,
144 g Glycin und
10 g SDS
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Luminol

55 µl 90 mM p-Cumarsäure (14,77 g/l in DMSO) und
125 µl 250 mM Luminol (44,3 g/l in DMSO) in
12,5 ml 100 mM Tris (pH 8,3) geben.
10 µl Perhydrol (konzentrierte H₂O₂-Lösung) in weitere 12,5 ml Tris hineingeben.
Beide Tris-Lösungen vermischen.

Radio-Immuno-Präzipitations-Assay (RIPA)-Puffer

8,8 g Natriumchlorid,
6,0 g Tris,
0,9 g EDTA,
10 ml 1% Igepal (Nonidet P-40),
5,0 g Na-Desoxycholat,
5 ml Natriumdodecylsulfat (SDS)
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.
Natriumchlorid, EDTA und Tris ansetzen und den pH auf 7,4 einstellen. Anschließend
restliche Inhaltsstoffe hinzugeben.
Jeweils vor Gebrauch dem fertigen Puffer noch Protease-Inhibitoren („Complete mini“) und
Phosphatase-Hemmer („Phospho-Stop“) zufügen.

Sammelgelpuffer

2 g SDS und
30,28 g Tris
mit aqua bidest. auf 500 ml auffüllen.

Sammelgel 4%

1 ml 30% Acrylamid,
4,7 ml aqua bidest.,
1,8 ml Sammelgelpuffer,
9 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED),
24 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS).

SDS-Probenpuffer pH 7,6

4,925 g Tris-HCl und
10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) in
100 ml Glycerol lösen.
15,4 mg/ml Dithiothreitol kurz vor Benutzung zugeben.
Zusätzlich 0,005% Bromphenolblau zu 500 ml Puffer addieren.

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) (10x)

500 ml Tris-HCl und
87 g Natriumchlorid
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.
Mit Natronlauge auf pH 7,6 einstellen.

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T)

200 ml 10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) und
2 ml Tween 20
mit aqua bidest. auf 1800 ml auffüllen.

Tris-gepufferte Salzlösung mit Thiomersal (TPBS) pH 7,4 (15x)

18,16 g Tris,
7,5 g Thiomersal,
135 g Natriumchlorid
in 700 ml Phosphatpuffer lösen.
Mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Trenngelpuffer

4 g SDS und
181,72 g Tris
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Trenngel 8 %

4,24 ml 30 % Acrylamid,
7,76 ml aqua bidest.,
4 ml Trenngelpuffer,
20 µl TEMED,
80 µl 10 % APS.

4.1.3.3. Lösungen und Standardpuffer für die Immunhistochemie

Ammoniakwasser

1,4 ml 25 %iger Ammoniak auf 250 ml aqua bidest.

Citrat-Puffer-Stammlösung A (0,1 M)

21,01 g Zitronensäure
in 1000 ml aqua bidest. lösen.

Citrat-Puffer-Stammlösung B (0,1 M)

29,41 g Natriumcitrat
in 1000 ml aqua bidest. lösen.

Citrat-Puffer (0,01 M) pH 6,0

36 ml Stammlösung A,
164 ml Stammlösung B,
1800 ml aqua bidest.
pH-Einstellung mittels 2 N Natronlauge.

Mowiol

6 g Glycerin,
2,4 g Mowiol 4-88,
6 ml aqua bidest.,
12 ml Tris-HCl (0,2 M; pH 8,5),
25 mg/ml Lösung DABCO.

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), pH 7,4

1,77 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat,
0,20 g Kaliumchlorid,
0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat,

8,18 g Natriumchlorid
in 1000 ml aqua bidest.

Streptavidin-Biotin-Komplex

100 µl Reagenz A (Streptavidin) und
100 µl Reagenz B (biotinylierte Peroxidase)
in 5 ml PBS/RSA 5%
(Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA).

Substratchromogen

2,5 ml 5x H₂O₂-Puffer,
5 Tropfen 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)
in 10 ml aqua bidest.
(BioGenex, Fremont, Kalifornien, USA).

4.1.4. Verwendete Antikörper

4.1.4.1. Primärantikörper

UMB-8

monoklonaler Kaninchen-Anti-Mensch-ETA-Antikörper (Zellkulturüberstand der entsprechenden Hybridoma-Zellen);

C-terminale Sequenz des Antigens beim Menschen: ⁴⁰⁸KNHDQNNHNTDR**SSHKDSMN**⁴²⁷
(Epitomics, Burlingame, Kalifornien, USA). Mögliche Phosphorylierungsstellen (Serin- oder Threoninreste) sind fett hervorgehoben.

Da die Sequenz des humanen ETA-Rezeptors der des Rezeptors bei der Maus und bei der Ratte sehr ähnlich ist, waren Kreuzreaktionen zu erwarten und auch beabsichtigt. In den untenstehenden C-terminalen Sequenzen des entsprechenden Maus- oder Ratten-Rezeptors sind die vom humanen ETA abweichenden Aminosäuren rot markiert.

C-terminale Sequenz des Antigens bei der Maus: ⁴⁰⁸KN**QE**QNNHNT**ER**SSHKDSMN⁴²⁷.

C-terminale Sequenz des Antigens bei der Ratte: ⁴⁰⁸KN**QE**QNH•NT**ER**SSHKDSMN⁴²⁶.

4.1.4.2. Sekundärantikörper

Sekundär-Antikörper für die Immunzytochemie

Alexa-488-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper,
IgG (H+L), 2 mg/ml,
Invitrogen, Oregon, USA.

Sekundär-Antikörper für die Western-Blot-Analysen

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper,
Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA.

Sekundär-Antikörper für die Immunhistochemie

biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper,
Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA.

4.2. Methoden

4.2.1. Zellkultur

Die Nierenzelllinie HEK-293 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) wurde mit Lipofectamin 2000 nach Herstellerangaben mit humaner ETA-DNA stabil transfiziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen in DMEM(+)-Medium (mit 400 µg/ml G418, Geneticin®) bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator.

4.2.2. Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden sowohl native als auch die stabil mit dem ETA transfizierten HEK-293-Zellen zunächst auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen in einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Zur Beschichtung wurde das Poly-L-Lysin zuvor in einer Verdünnung von 1:10 auf die Deckgläschen gegeben und diese dann für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit aqua bidest. gewaschen und die Deckgläschen über eine Stunde getrocknet. Anschließend wurden etwa 150.000 Zellen pro Well auf die Deckgläser ausgesät und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM(+) wachsen gelassen.

Am nächsten Tag wurden die stabil mit dem ETA transfizierten Zellen in der Hälfte der Wells mit ET-1 in einer Konzentration von 1 µM (gelöst in DMEM(+)) für 30 Minuten stimuliert. Die nativen und die restlichen ETA-transfizierten Zellen verblieben unstimuliert und erhielten lediglich die gleiche Menge an DMEM(+). Danach wurden die Zellen drei Mal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit ZAMBONI-Fixierlösung fixiert. Nachfolgend wurden die Wells mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen mit eiskaltem 50%-igem und 100%-igem Methanol für jeweils 2 Minuten. Nach dreimaligem Spülen wurden die Zellen in 3%-igem normalem Ziegenserum in PBS-Puffer für 2 Stunden inkubiert, um verschiedene Ladungen und damit eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu blockieren. Schließlich wurden 300 µl des Antikörpers UMB-8 in einer

Verdünnung von 1:10 in PBS mit 1%igem normalen Ziegenserum auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Orbitalschüttler inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde am nächsten Tag der mit dem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte Sekundärantikörper (Alexa-488-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper) in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben (Abbildung 4). Der ungebundene Anteil wurde nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wiederum durch mehrmaliges Spülen mit PBS abgewaschen. Schließlich wurden die Deckgläschen mit den so gefärbten Zellen mit Fluoromount-G auf Objektträger aufgebracht und bis zur Auswertung der Färbeergebnisse am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta) lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

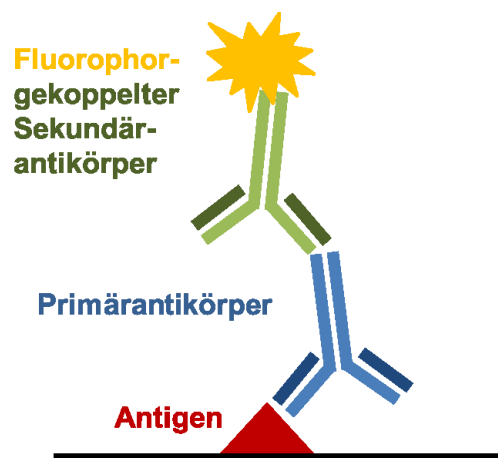


Abbildung 4: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit für die immunzytochemischen Untersuchungen eingesetzten Immunfluoreszenz-Methode. Der Primärantikörper UMB-8 (blau), bindet sein Antigen, den ETA-Rezeptor (rot). An den Primärantikörper koppelt artspezifisch ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper, der Alexa-488-gekoppelte Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper (grün). Die Fluoreszenz ermöglicht indirekt über den Primär- und den Sekundärantikörper die Lokalisation des gesuchten Antigens.

4.2.3. Rezeptoranreicherung aus Zellen und Geweben, SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Western-Blot-Analysen

4.2.3.1. Aufbereitung der HEK-293-Zellen

Sowohl native als auch die mit dem humanen ETA stabil transfizierten HEK-293-Zellen wurden in mit Poly-L-Lysin beschichteten 60-mm-Platten bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Für die Western-Blot-Analysen wurden die Zellen für 0, 5 oder 10 Minuten mit ET-1 stimuliert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden zum Lysieren der Zellen 800 µl Radioimmunpräzipitations-Puffer (RIPA-Puffer), der zuvor mit Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Hemmern (Complete-Mini®, PHOSStop®; Roche, Mannheim, Deutschland) versetzt worden war, für 10 Minuten auf die eisgekühlten Zellen gegeben. Die

Zellen wurden daraufhin mit einem Zellschaber von den Platten abgelöst und das Lysat in 1-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, um erneut für 10 min auf Eis inkubiert zu werden. Anschließend wurden die Lysate für 30 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert. Im Überstand lagen nun die gelösten Proteine vor. Dieser Überstand wurde für die Rezeptorisolation weiterverwendet.

4.2.3.2. Aufbereitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme aus den Mäusen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um enzymatische Abbauvorgänge zu verhindern. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebeproben mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert und in 1-ml-Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurde jede Probe mit 500 µl RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren, Phosphatasehemmern (Complete-Mini®, PHOSStop®; Roche, Mannheim, Deutschland) und Pepstatin versetzt und mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators im Eisbad homogenisiert. Die Gewebeproben wurden anschließend für 2 Stunden bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Abschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert und der Überstand, in dem nun die gelösten Proteine vorlagen, für die Rezeptorisolation eingesetzt.

4.2.3.3. Isolierung der Membranproteine mittels WGA-Beads

Zur Anreicherung von Rezeptorproteinen mit Hilfe von Weizenkeimlecithin-Agarose-Kügelchen (WGA-Beads) nutzt man die Glykosylierungsstellen, welche bei den meisten Membranproteinen vorkommen. Über diese binden die Rezeptorproteine an die WGA-Beads und können auf diese Weise isoliert werden. Hierfür wurden 40 µl WGA-Beads in 1-ml-Eppendorf-Gefäße pipettiert, diese zweimal mit 1 ml RIPA-Puffer ohne Inhibitoren gewaschen und jeweils für eine ausreichende Pellettierung anzentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände der Lysate zu den WGA-Beads gegeben und für 2 Stunden bei 4°C in einem Drehrad invertiert. Danach wurden die Proben dreimal mit 1 ml eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen und der Ansatz jeweils in der Kühlzentrifuge zur Pellettierung anzentrifugiert. Nach dem Waschen befanden sich nur noch die an den WGA-Beads gebundenen Membranproteine in den Pellets. Für die Rezeptor-Dephosphorylierungs-Experimente wurden die Proben anschließend zusätzlich für 3 Stunden bei 37°C mit Lambda-Protein-Phosphatase (λ -PP) (800 U; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) inkubiert und dann erneut zur Pellettierung zentrifugiert. Nach dem entsprechenden letzten Zentrifugationsschritt wurden die Proben mit 80 µl 1xSDS-Probenpuffer versetzt und für 20 min bei 60°C inkubiert. Die Denaturierungseigenschaften von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden hierbei genutzt, um die aufgereinigten Rezeptorproteine von den WGA-Beads zu lösen. Nach der Inkubation wurden die WGA-Beads durch eine fünfminütige Zentrifugation

bei 16000 rpm abgetrennt. Der Überstand mit den gelösten Membranproteinen wurde anschließend für die elektrophoretische Proteinauftrennung benutzt.

4.2.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) mit Tris-Glycin-Puffer durchgeführt. Ziel der Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist die Auftrennung der Proteine nach deren Größe. Hierbei spielt das Detergenz SDS eine entscheidende Rolle, denn es maskiert einerseits die Eigenladungen der Proteine, da es stark negativ geladen ist. Andererseits denaturiert es bei hohen Temperaturen die Proteine, wodurch ausschließlich deren Größe für die Wanderungsgeschwindigkeit bei der nachfolgenden Elektrophorese maßgeblich wird. Kleine Proteine wandern dabei schneller und weiter durch das wie ein Molekularsieb wirkende Gel als größere.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden ein 4%-iges Sammelgel und ein 8%-iges Trenngel eingesetzt, welche in die mit Tris-Glycin-Puffer befüllte Elektrophoresekammer eingesetzt wurden. In die Taschen des Sammelgels wurden 20 µl der Proben und zur späteren Größenabschätzung der Proteine in die jeweils erste Tasche ein Molekulargewichtsmarker (Prestained PageRuler®; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) gegeben. Daraufhin wurde an die Elektrophoresekammer die Spannung angelegt, zunächst 90 V für 10 min, bis die Lauffront innerhalb des Sammelgels die Grenze zum Trenngel erreicht hatte, gefolgt von 130 V für 1 h, bis die blaue Lauffront das Trenngel durchlaufen hatte.

4.2.3.5. Western-Blot-Analysen

Nach Entnahme der Gele aus der Elektrophoresekammer wurden die Sammelgele von den Trenngelen abgetrennt und verworfen. Die Trenngele und das Blot-Papier wurden für 10 Minuten in Blotpuffer inkubiert und gleichzeitig eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) in 100%-igem Methanol für 5 Minuten aktiviert. Daraufhin wurde in die Transferzelle der Blotkammer auf die Anode ein Blot-Papier gelegt, gefolgt von der aktivierten PVDF-Membran, dem Gel und abschließend einer weiteren Schicht Blot-Papier. Nach dem Anlegen von 250 mA an die Kathode erfolgte das Blotten der Proteine auf die Membran innerhalb von 60 min.

Anschließend wurde die PVDF-Membran aus der Blotkammer entnommen und für 45 min bei 140 U/min auf einem Schüttler in 5%-igem Rinderserumalbumin (RSA) in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T) inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Dann wurden die Membranen mit dem UMB-8 in einer Verdünnung von 1:50 über Nacht bei 4°C auf einem Orbitalschüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper, ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper, in einer Verdünnung von 1:5000 in 5%-igem RSA in TBS-T hinzugegeben. Nach 2-stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die Membranen erneut dreimal mit TBS-T gewaschen.

Zwischenzeitlich wurde das p-Cumarsäure-Luminol-Gemisch angesetzt. In diesem Gemisch wurden die Membranen für einige Minuten inkubiert und anschließend in Filmkassetten eingespannt. In der Dunkelkammer wurde in die Kassetten noch ein Chemilumineszenz-sensitiver Röntgenfilm eingelegt. Hierbei katalysierte die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase, nach Zugabe der Reagenzien Wasserstoffperoxid und Luminol, eine Lichtreaktion. Dadurch wurde entsprechend der Stärke und der Position der Bande der Röntgenfilm belichtet. Abschließend wurden die Filme in einer Entwicklermaschine entwickelt.

4.2.4. Immunhistochemie

Um den ETA mittels Immunhistochemie in den Gewebeschnitten nachweisen zu können wurde die Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode, die auch als indirekte Peroxidase-Reaktion bezeichnet wird, verwendet (Abbildung 5).

Hierfür wurde der UMB-8 in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200. An diesen wiederum wurde ein Streptavidin/biotinylierte Meerrettichperoxidase-Komplex (ABC) in einer Verdünnung von 1:50 gekoppelt. Die Präparate wurden anschließend mit dem Substratchromogen AEC versetzt, welches von der Peroxidase umgesetzt wurde. Dadurch gab es einen Farbumschlag; die zu erkennende Rot-Braunfärbung war schließlich ein indirekter Indikator für die Lokalisation der gesuchten Rezeptoren. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte jeweils mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)/1% RSA gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper bzw. Komplexe zu entfernen. Die genaue Durchführung der immunhistochemischen Färbung der Präparate geschah nach dem in Tabelle 5 aufgeführten Protokoll.

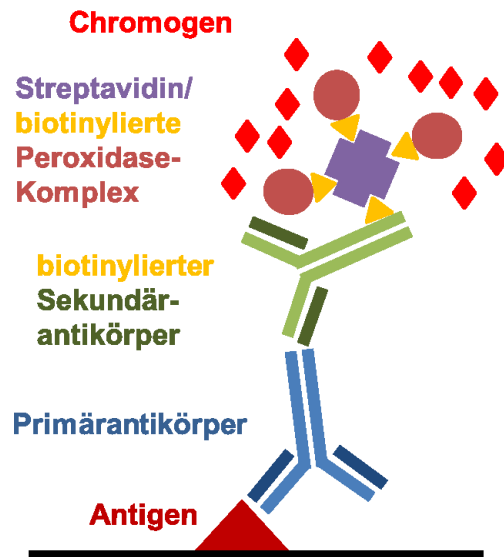


Abbildung 5: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode. Zunächst wird der antigenspezifische Primärantikörper hinzugegeben (blau). Dieser wird vom artspezifischen biotinylierte Sekundärantikörper gebunden (grün). An das Biotin koppelt der Streptavidin/biotinylierte Meerrettich-Peroxidase-Komplex. Durch die Umsetzung des dazugegebenen Enzymsubstrates ergibt sich ein rot-brauner Farbumschlag.

Tabelle 5: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten.

Arbeitsschritte	Lösungen	Mengen [µl]	Inkubations- zeit [min]
1. Für die nachfolgenden Schritte werden alle Präparate in Glas-Färbeküvetten einsortiert.			
2. Entparaffinieren	Xylol		20
	Xylol		20
	Xylol		20
3. Xylol entfernen	100% Ethanol		20
	100% Ethanol		20
	100% Ethanol		20
4. Blockierung der endogenen Peroxidase, um unspezifische Färbungen zu verhindern	3% H ₂ O ₂ in Methanol		45
5. Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende	95% Ethanol		2

Alkoholreihe	95% Ethanol		2
	80% Ethanol		2
	70% Ethanol		2
	aqua bidest.		5
	aqua bidest.		5
6. Für den nachfolgenden Schritt werden alle Objektträger aus den Glas-Färbeküvetten in Citrat-Puffer-gefüllte Plastikküvetten umsortiert.			
7. Demaskierung der Antigene zur Verstärkung der Signalintensität	im Citrat-Puffer (0,01 M, pH 6,0) in der Mikrowelle bei 600 W:		
	Kochen		8
	Abkühlen		4
	Kochen		4
	Abkühlen		4
	Kochen		4
8. Im Anschluss müssen die Präparate für etwa 30 Minuten auf handwarm abkühlen und werden dann in den Körben der Plastikküvetten für mindestens 5 Minuten in aqua bidest. gestellt.			
9. pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes, um unspezifische Bindungen zu verhindern	PBS mit 1% RSA		5
10. Für die weiteren Schritte werden die Objektträger in Sequenza®-Färbesysteme einsortiert. Bei diesem System entsteht nach Einbringen der Präparate ein kapillärer Spalt, über welchen die weiteren Lösungen zugegeben werden.			
11. pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes	PBS mit 1% RSA	1500	

12. Blockierung unspezifischer Bindungen, um Hintergrundfärbungen zu vermeiden	normales Ziegen-Serum (entspricht der Spezies des Sekundär-Antikörpers)	150	20
13. Bindung des Primär-Antikörpers (AK)	UMB-8	300	bei 4 °C über Nacht (im Kühlraum)
14. Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene AK zu entfernen	PBS mit 1% RSA PBS mit 1% RSA	1500 1500	
15. Zugabe des Sekundär-Antikörpers (AK)	Biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper	150	30
16. Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene AK zu entfernen	PBS mit 1% RSA	1500	
17. Zugabe des enzymgekoppelten Komplexes, um die Farbreaktion zu ermöglichen	Avidin-Peroxidase-Komplex	150	30
18. Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene Komplexe zu entfernen	PBS mit 1% RSA	1500	
19. Färben der AK-gebundenen Bereiche durch Zugabe des Substratchromogens	AEC AEC	150 150	15 15
20. Waschen und damit Stoppen der Reaktion	aqua bidest.	1500	
21. Für die weitere Bearbeitung werden die Präparate aus dem Färbesystem in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert.			
22. Waschen	aqua bidest. aqua bidest.		1 1

23. Gegenfärbung der Zellkerne	Mayer's Hämatoxylin		50 sek
24. Waschen	aqua bidest.		2,5
25. Hämatoxylin-Bläuung	Ammoniakwasser		5x Eintauchen
26. Waschen	aqua bidest.		2,5
27. Im Anschluss daran werden die Präparate mit Mowiol und Deckgläsern eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.			

Wie bei den Western-Blot-Analysen wurden auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen zusätzliche Rezeptor-Dephosphorylierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die Präparate nach dem Einspannen in die Sequenza®-Färbesysteme einmal mit 1500 µl PBS gespült und dann mit 150 µl λ-PP (800 U; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) über 3 Stunden inkubiert. Danach wurde nach dreimaligem Spülen mit PBS und einmaligem Waschen mit PBS/1% RSA ab Punkt 12 (Inkubation in normalem Ziegenserum, um unspezifische Bindungen zu verhindern) in der Durchführung des immunhistochemischen Protokolls fortgefahren.

4.2.4.1. Peptidneutralisation

Für den zusätzlichen Spezifitätsnachweis des UMB-8 wurden sowohl bei den Western-Blot-Analysen als auch bei den immunhistochemischen Färbungen an ausgewählten positiven Präparaten Peptidneutralisationen durchgeführt. Hierzu wurde der UMB-8 (Verdünnung 1:10 in PBS/1% RSA) für 2 h mit 10 µg/ml des Peptids, welches für die Immunisierung des Kaninchens und somit für die Herstellung der Antikörper verwendet worden war, bei Raumtemperatur inkubiert. Anstatt nur des Primärantikörpers UMB-8 wurde dann das Antikörper-Peptid-Gemisch auf die PVDF-Membranen bzw. auf die Präparate gegeben. Bei gegebener Spezifität der Antikörper führt dies zur vollständigen Neutralisation der jeweiligen Immunsignale.

5. Ergebnisse

5.1. Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen

Die immunzytochemischen Experimente erfolgten sowohl an nativen als auch an stabil mit dem humanen ETA transfizierten HEK-293-Zellen. Während sich bei den nativen, den ETA nicht exprimierenden Zellen kein Immunsignal zeigte, fand sich bei den stabil mit dem ETA transfizierten Zellen eine deutliche, vorwiegend membranständige Fluoreszenz. Eine Stimulation der stabil mit dem ETA transfizierten Zellen mit 1 μ M ET-1 für 30 Minuten führte zu einer Verlagerung des Immunsignals in das Zytosol, entsprechend einer Agonist-induzierten Internalisierung der Rezeptoren (Abbildung 6).

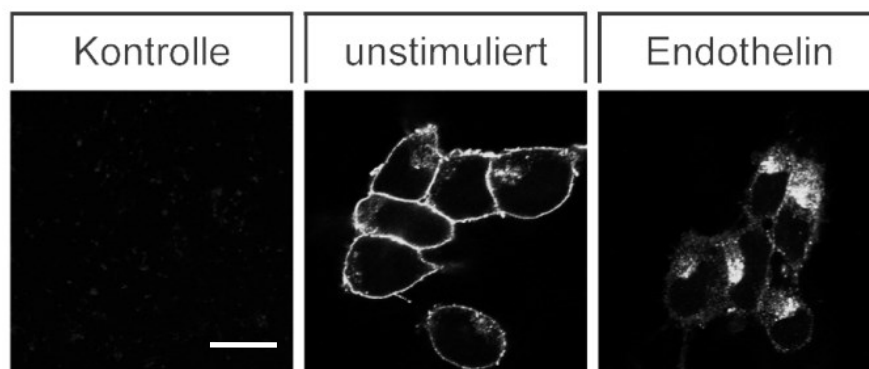


Abbildung 6: Immunzytochemie an HEK-293-Zellen. Native oder stabil mit dem humanen ETA transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit dem Anti-ETA-Antikörper UMB-8 inkubiert. Der gebundene Primärantikörper wurde anschließend mit Hilfe des Alexa-488-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers visualisiert. Maßstabsbalken: 20 μ m. Kontrolle: native, den humanen ETA nicht exprimierende HEK-293-Zellen. Unstimuliert: stabil mit dem ETA transfizierte HEK-293-Zellen. Endothelin: stabil mit dem humanen ETA transfizierte HEK-293-Zellen nach Stimulation mit 1 μ M ET-1 für 30 Minuten.

5.2. Western-Blot-Analysen

5.2.1. Western-Blot-Analysen an HEK-293-Zellen

Auch in den Western-Blot-Analysen zeigte sich bei den nativen, den humanen ETA nicht exprimierenden Zellen kein Immunsignal, während bei den mit dem ETA transfizierten Zellen der Anti-ETA-Antikörper UMB-8 zu einer breiten Bande bei etwa 60-90 kDa führte (Abbildung 7A).

Nach Stimulation der mit dem ETA transfizierten Zellen über 5 oder 10 Minuten mit 1 μ M ET-1 fand sich eine zunehmende Abnahme der Intensität des Immunsignals im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (0 Minuten Stimulation) (Abbildung 7B, linker Blot). Dies deutet auf eine Phosphosensitivität des Antikörpers UMB-8 hin, d.h. nach Agonist-induzierter Phosphorylierung des C-terminalen Endes des Rezeptors (dieses enthält 4 mögliche

Phosphorylierungsstellen) kann der Antikörper diesen aufgrund der nun vorhandenen Phospho-Reste nicht mehr binden. Um dies zu beweisen, wurden die Membranpräparationen der Zellen über 3 Stunden mittels Lambda-Protein-Phosphatase (λ -PP) behandelt (und damit die Threonin- bzw. Serin-Reste dephosphoryliert) und anschließend erneut auf die Gele aufgetragen. Nun zeigte sich die zuvor beobachtete Verminderung der Stärke des Immunsignals nach Stimulation mit ET-1 nicht mehr (Abbildung 7B, rechter Blot).

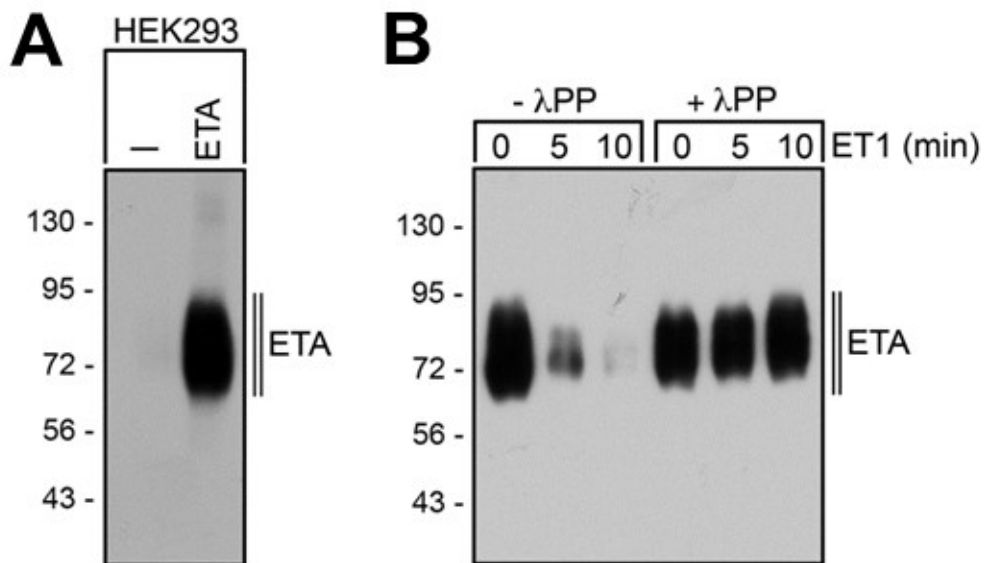


Abbildung 7: Western-Blot-Analysen an nativen bzw. stabil mit dem humanen ETA transfizierten HEK-293-Zellen. Die Rezeptoren wurden mittels WGA-Beads angereichert und die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen gebロットet. Die Membranen wurden anschließend in UMB-8 inkubiert und mittels Chemilumineszenz detektiert. Am linken Rand der Blots ist jeweils der Molekulargewichtsmarker (kDa) eingezeichnet.

A: Links native, den humanen ETA nicht exprimierende Zellen; rechts: stabil mit dem ETA transfizierte HEK-293-Zellen.

B: Stabil den humanen ETA exprimierende Zellen wurden über 0, 5 oder 10 Minuten mit ET-1 stimuliert. Die Rezeptoren wurden mittels WGA-Beads angereichert und vor der SDS-PAGE entweder nicht behandelt (linke Seite des Blots; - λ PP) oder zusätzlich über 3 Stunden mit Hilfe von Lambda-Protein-Phosphatase enzymatisch dephosphoryliert (rechte Seite des Blots; + λ PP).

5.2.2 Western-Blot-Analysen an normalen Mausgeweben

An normalen Mausgeweben konnten mit dem UMB-8 deutliche Banden im Bereich von 60 bis 90 kDa insbesondere beim Herz, aber auch beim Gehirn, bei der Lunge, der Milz und beim Rückenmark beobachtet werden. Bei der Niere und beim Colon zeigte sich dagegen kein Immunsignal (Abbildung 8, linker Blot).

Zum zusätzlichen Nachweis der Spezifität des Antikörpers wurde eine Peptidneutralisation durchgeführt. Hierzu wurde der Antikörper UMB-8 über 2 Stunden mit dem zur

Immunisierung des Kaninchens verwendeten Peptid inkubiert, bevor er auf die Membranen gegeben wurde. Dies führte dazu, dass die zuvor mit dem Anti-ETA-Antikörper UMB-8 detektierten Banden nun nicht mehr nachweisbar waren (Abbildung 8, rechter Blot).

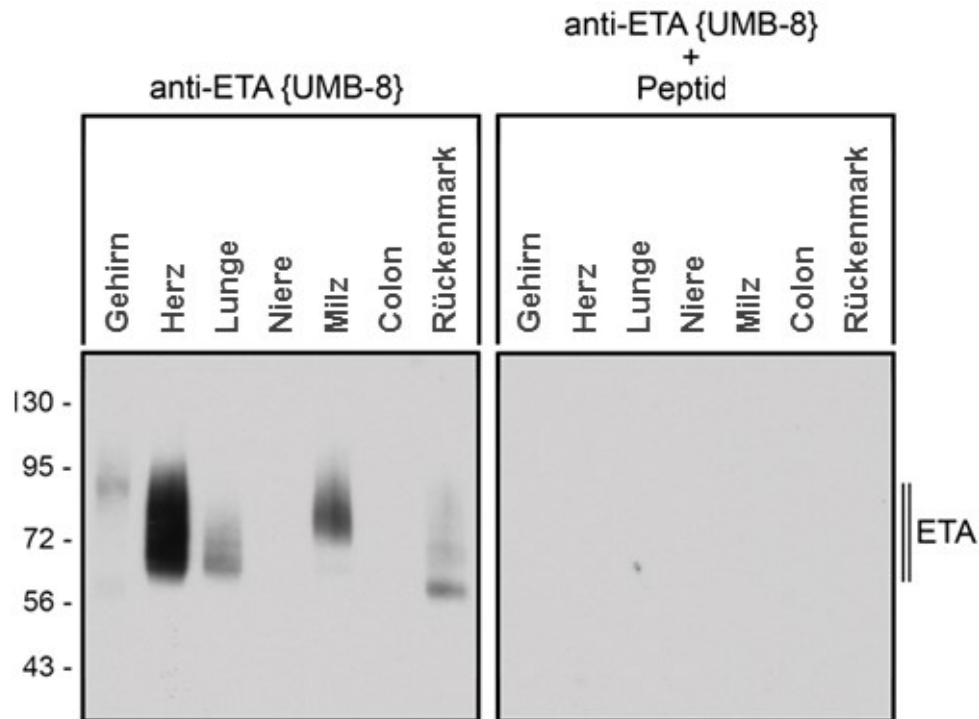


Abbildung 8: Western-Blot-Analysen an normalem Mausgewebe. Die Rezeptoren wurden mittels WGA-Beads angereichert und die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Membranen wurden anschließend in UMB-8 inkubiert und mittels Chemilumineszenz detektiert. Am linken Rand der Blots ist jeweils der Molekulargewichtsmarker (kDa) eingezeichnet. Der Anti-ETA-Antikörper UMB-8 detektierte ein breites Signal zwischen 60 und 90 kDa bei Gehirn, Herz, Lunge, Milz und Rückenmark (linker Blot). Nach Peptidneutralisation mit dem antigenen Peptid des Anti-ETA-Antikörpers waren die Banden nicht mehr sichtbar (rechter Blot).

5.3. Immunhistochemische Untersuchungen

5.3.1. Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Rattengeweben

Es wurde große Anzahl an verschiedenen normalen Rattengeweben immunhistochemisch gefärbt, um die Verteilung des ETA in dieser Spezies zu untersuchen. Dabei waren (mit wenigen Ausnahmen) die meisten untersuchten Gewebe ETA-negativ (Abbildungen 9, 10, 11). Lediglich im Herzmuskelgewebe, insbesondere in den Herzvorhöfen konnte eine ETA-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 10C). Weiterhin zeigte sich in allen untersuchten Organen eine deutliche Präsenz des Rezeptors in der glatten Muskulatur von Gefäßen und in Kapillaren (Abbildungen 9, 10, 11). In der Lunge fand sich der ETA neben den Kapillaren der Alveolarwände zusätzlich auch in der glatten Muskulatur der größeren Gefäße und der Bronchien (Abbildungen 10A, 10B). In der Niere konnte eine ETA-

Expression in den Vasa recta, in den afferenten und efferenten Arteriolen der Glomeruli sowie in den glomerulären Mesangiumzellen verzeichnet werden (Abbildung 10D). Im Epithel der Samenblasen waren einzelne Zellen, die möglicherweise Basalzellen entsprechen, ebenfalls stark ETA-positiv (Abbildung 11C). Daneben konnte eine ETA-Expression in den Fibroblasten und Fibrozyten des Bindegewebes in fast allen untersuchten Organen festgestellt werden. In den meisten Fällen zeigte sich eine vorwiegend membranständige, teilweise aber auch zytoplasmatische Färbung der ETA-positiven Zellen.

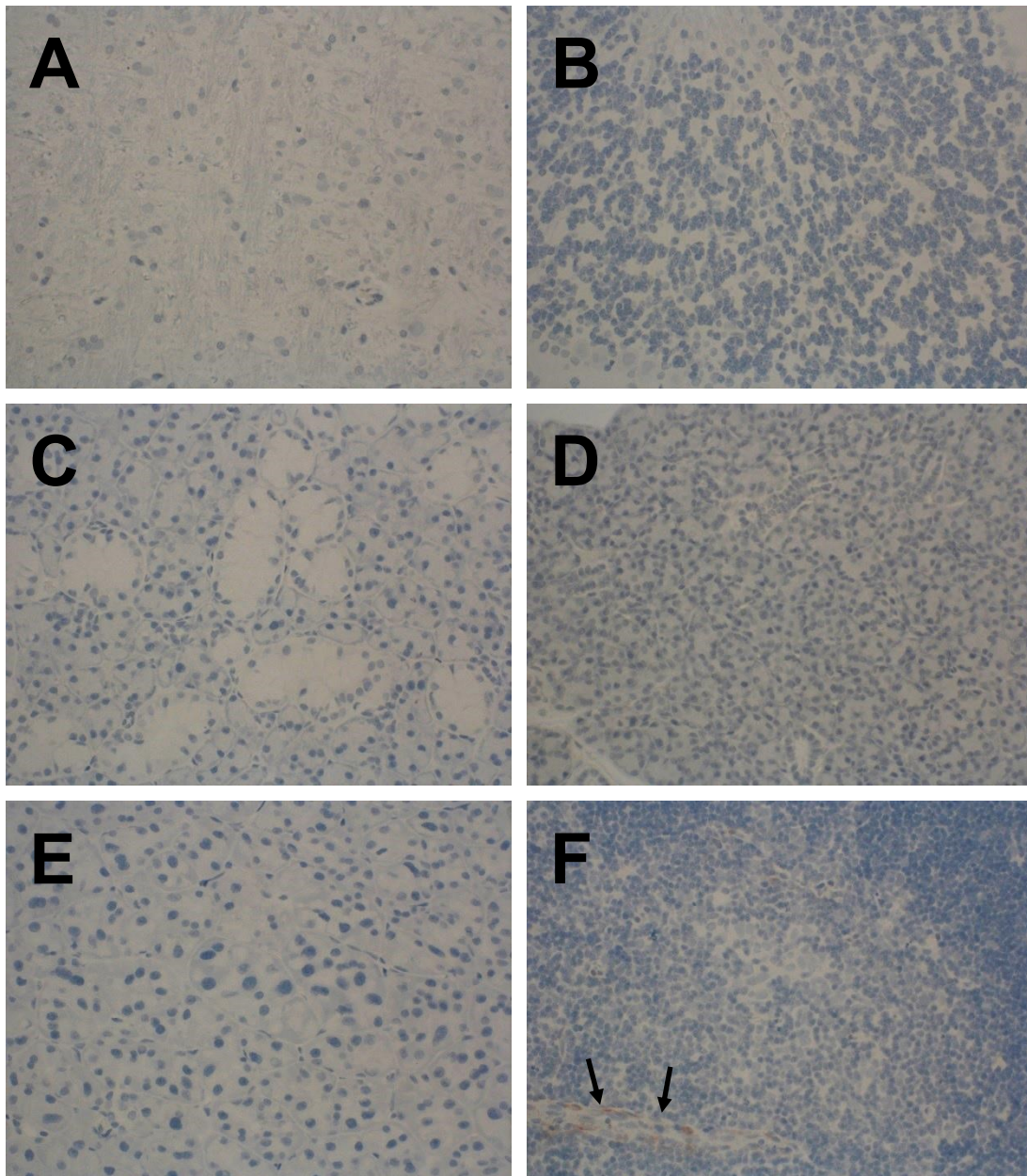


Abbildung 9: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen Normalgeweben der Ratte (1). A: Großhirn, Mark, B: Kleinhirn, C: Glandula sublingualis, D: Parotis, E: Harder'sche Tränendrüse, F: Thymus (Pfeile: positives Gefäß). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x400.

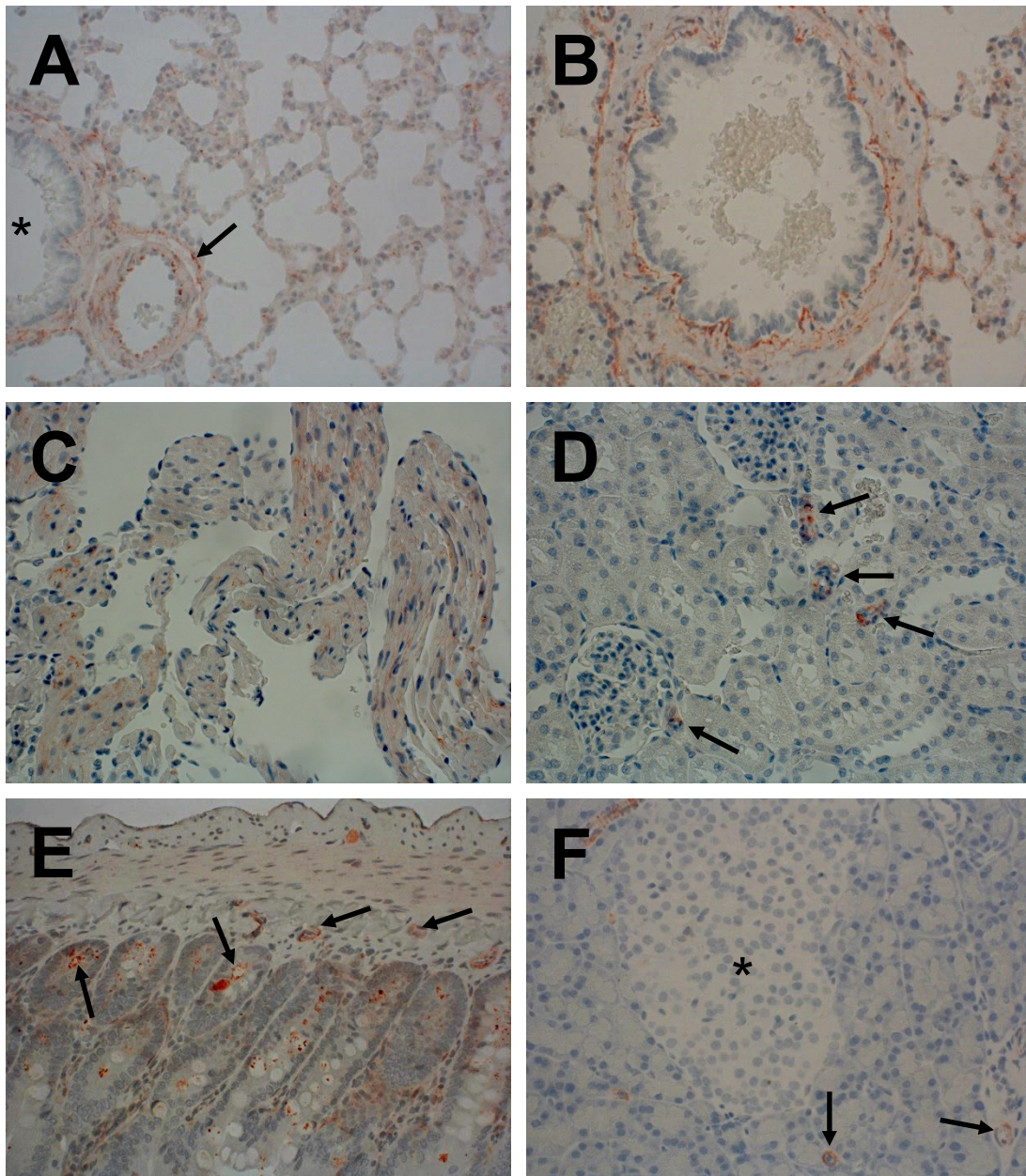


Abbildung 10: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen Normalgeweben der Ratte (2).
 A: Lunge (Stern: positiver Bronchus; Pfeil: positives Gefäß), B: Bronchus, C: Herzvorhof, D: Niere (Pfeile: positive Gefäße), E: Duodenum (Pfeile: positive Gefäße), F: Pankreas (Stern: Insel; Pfeile: positive Gefäße). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x400.

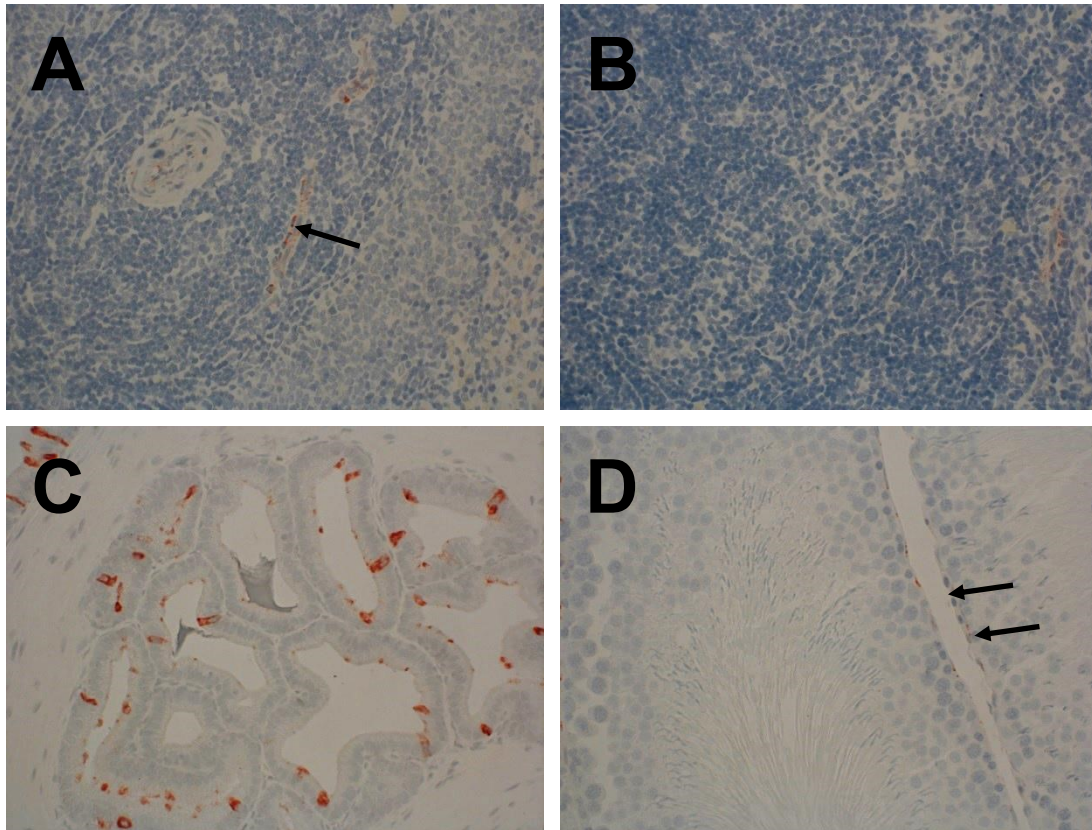


Abbildung 11: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen Normalgeweben der Ratte (3). A: Milz (Pfeil: positives Gefäß), B: Lymphknoten, C: Samenblase, D: Hoden (Pfeile: positives Gefäß). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x400.

5.3.2. Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Mausgeweben

Parallel zu den Rattengeweben wurden auch die entsprechenden Normalgewebe von Mäusen immunhistochemisch untersucht, um eventuelle Speziesunterschiede zwischen diesen beiden am häufigsten genutzten Labortieren zu erfassen. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in den Färbeergebnissen zwischen den Ratten- und Mausgeweben. Auch bei der Maus waren die meisten untersuchten Gewebe bis auf die Herzmuskulatur, die Muskulatur der Arteriolen, die Kapillaren, die Bronchialmuskulatur, die Gefäße und Mesangiumzellen der Nieren und die Fibroblasten und Fibrozyten des Bindegewebes ETA-negativ (Abbildung 12). Die positiven Zellen waren auch hier entweder membranständig oder zytoplasmatisch gefärbt.

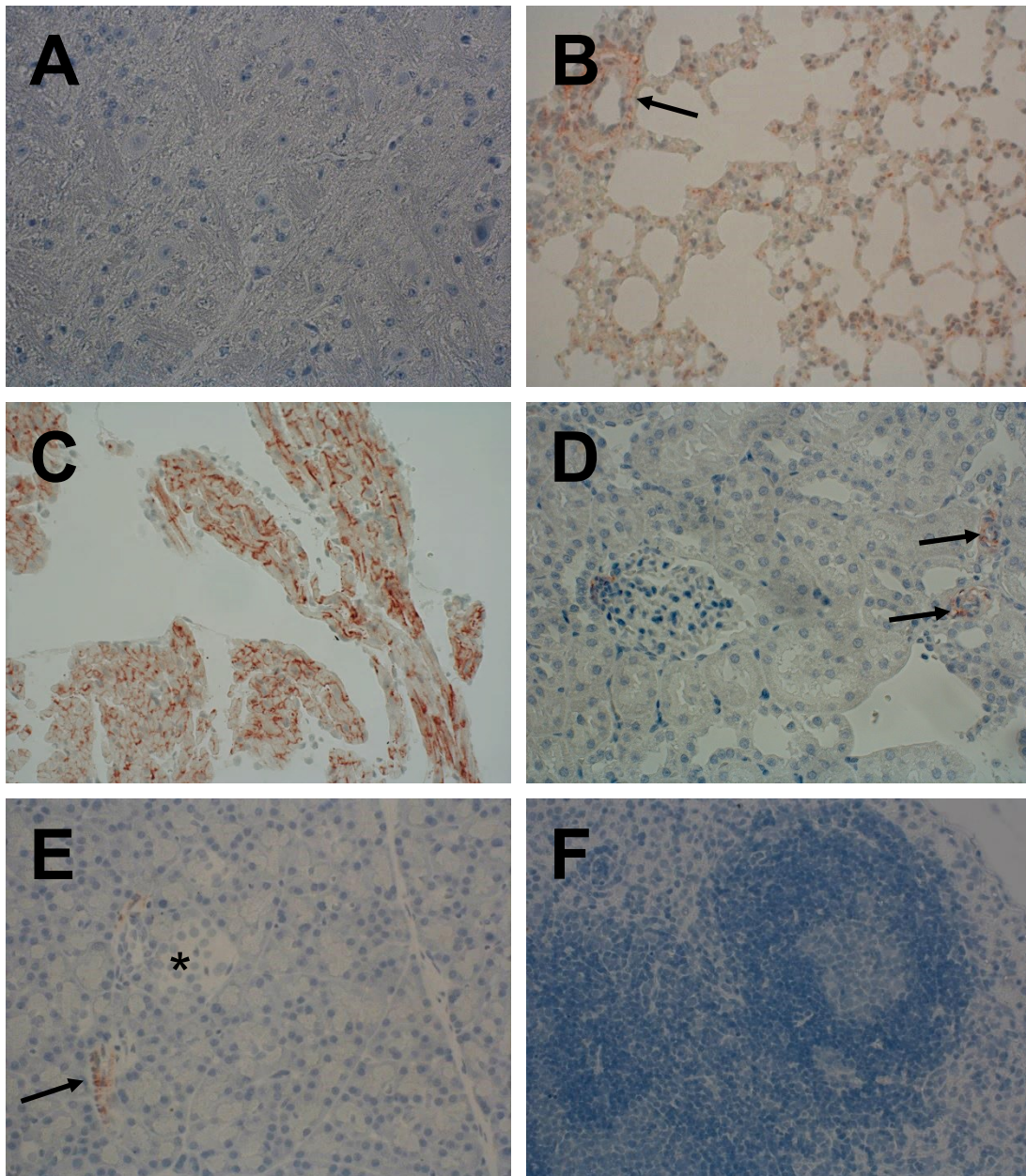


Abbildung 12: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen Normalgeweben der Maus. A: Großhirn, Mark, B: Lunge (Pfeil: positives Gefäß), C: Herzmuskulatur, D: Niere (Pfeile: positive Gefäße), E: Pankreas (Stern: Insel; Pfeil: positives Gefäß), F: Lymphknoten. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x400.

5.3.3. Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Humangeweben

Es wurde weiterhin eine Vielzahl tumorfreier humaner Gewebe immunhistochemisch gefärbt, um die Verteilung des ETA im menschlichen Körper zu untersuchen und einen Speziesvergleich mit der Ratte und der Maus zu ermöglichen.

Wie bei der Ratte und der Maus waren die meisten der untersuchten Gewebe bis auf wenige Ausnahmen negativ. Eine deutliche ETA-Expression konnte wiederum im Herzmuskelgewebe, insbesondere in den Herzvorhöfen (Abbildung 13A), sowie in der glatten Muskulatur von Gefäßen und in Kapillaren sowie in der Placenta (Abbildung 13F) nachgewiesen werden. Wie bei der Ratte und bei der Maus fand sich der ETA in der Lunge in den Kapillaren der Alveolarwände und in der glatten Muskulatur der größeren Gefäße und der Bronchien. Ebenso zeigte sich der ETA in der Niere in den Vasa recta, in den afferenten und efferenten Arteriolen der Glomeruli und in den glomerulären Mesangiumzellen (Abbildung 13B). Weiterhin wurde wie bei der Ratte und der Maus eine ETA-Expression im Bindegewebe (Kapillaren, Fibroblasten, Fibrozyten) fast aller untersuchter Organe, vor allem aber im Herzen, im Magen, im Darm, im Pankreas, in den Nieren und in den Hoden festgestellt (Abbildung 13C, 13D). Daneben wiesen aktivierte Itozellen von zirrhotischen Lebern eine deutliche ETA-Expression auf. Stark ETA-positiv waren außerdem die fibroblastischen Retikulumzellen innerhalb der roten Milzpulpa und um die Follikel der Lymphknoten herum (Abbildung 13E), ein Befund der in dieser Form bei der Ratte und bei der Maus nicht erhoben werden konnte. In den meisten Fällen zeigte sich auch beim Menschen eine vorwiegend membranständige, teilweise aber auch zytoplasmatische Färbung der ETA-positiven Zellen.

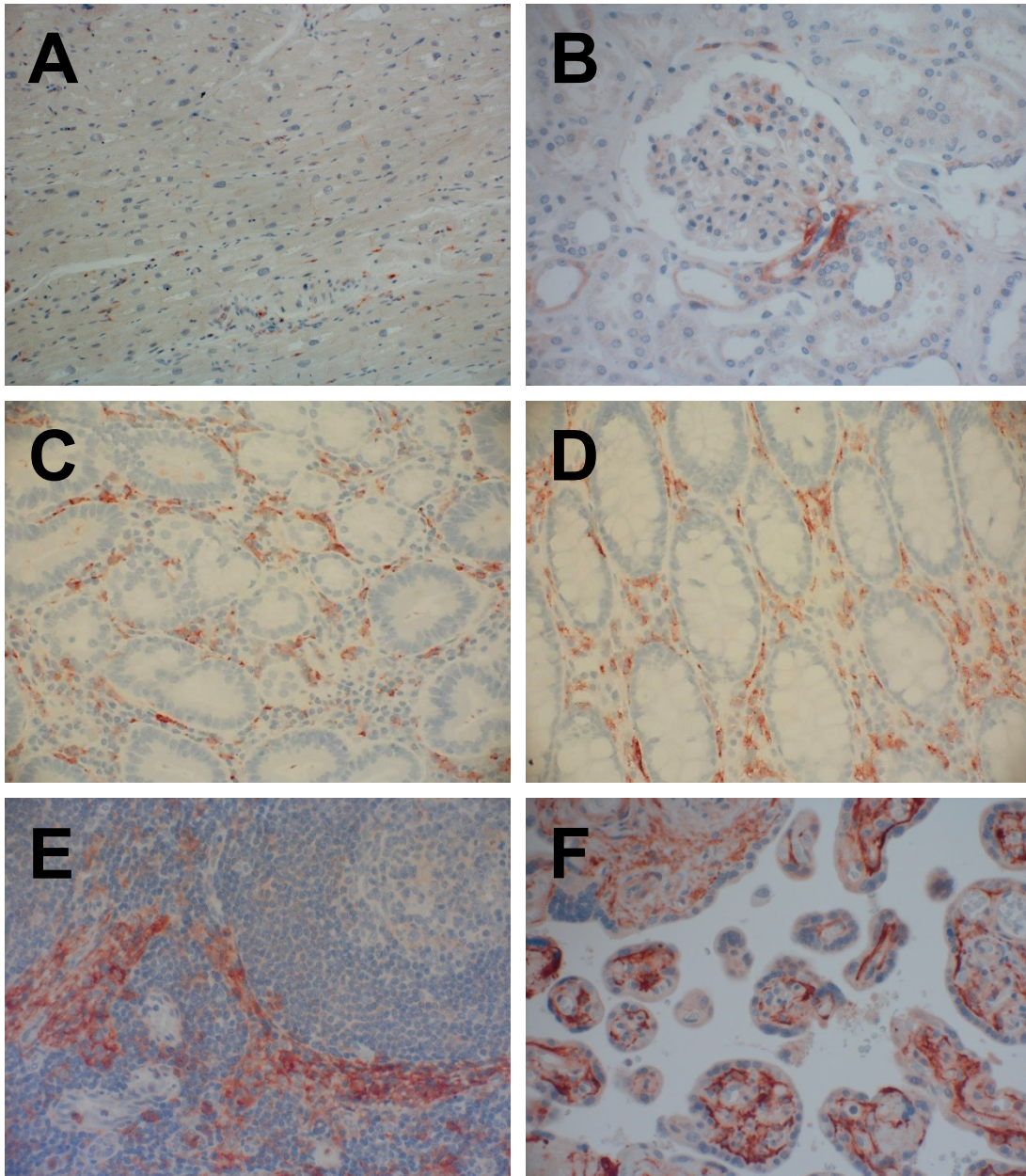


Abbildung 13: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen humanen Normalgeweben.

A: Herz, B: Niere, C: Duodenum, D: Rektum, E: Lymphknoten, F: Placenta. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x400.

5.3.4. Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumoren

Neben dem normalen Humangewebe wurde auch eine große Serie an menschlichen Tumorpräparaten mit dem UMB-8 gefärbt, mit dem Ziel, die Expression des ETA in verschiedenen Tumorentitäten zu erfassen. Die Ergebnisse dieser Färbungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst und beispielhaft in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

Eine starke ETA-Positivität mit einer hohen Prävalenz zeigte sich insbesondere in stark vaskularisierten Tumoren, wie in Glioblastomen, in Schilddrüsen-Karzinomen, in hepatozellulären Karzinomen, in Ovarialkarzinomen und in allen Typen von Sarkomen (Angiosarkome, Liposarkome, Rhabdomyosarkome, Leiomyosarkome, pleomorphe Sarkome und Osteosarkome). Hier wiesen sowohl die Tumorzellen selber als auch die Tumorgefäße eine sehr starke, membranständige ETA-Expression auf. Der Rezeptor war aber auch unabhängig von einer ETA-Positivität oder -Negativität im Stroma (Kapillaren, Fibroblasten, Fibrozyten) zahlreicher anderer epithelialer Tumore, wie z.B. in Pankreas-, Nieren-, Harnblasen-, Prostata-, Mamma- oder Cervixkarzinomen, detektierbar. In Lungen- oder Magenkarzinomen, in Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), in Phäochromozytomen, in neuroendokrinen Tumoren oder in Hämangiomen war die ETA-Expression jedoch entweder nur sehr gering ausgeprägt oder die Tumore negativ.

Tabelle 6: ETA-Expression in verschiedenen humanen Tumor-Entitäten

Tumorentität (Gesamtzahl an Fällen)	Tumorzellen		Tumor-Stroma	
	Positivität n (%)	Intensität ¹	Positivität n (%)	Intensität ¹
GH-Hypophysenadenome (7)	1 (14%)	+++	7 (100%)	+++
Glioblastome (20)	6 (85%)	+++	6 (85%)	+++
Schilddrüsenkarzinome (3)	2 (67%)	+++	3 (100%)	+++
Lungentumore (15)	1 (7%)	++	15 (100%)	+
- Adenokarzinome (5)	1 (23%)	++	5 (100%)	+
- Plattenepithelkarzinome (5)	0 (0%)	---	5 (100%)	+
- Kleinzelliges Bronchialkarzinom (5)	0 (0%)	---	5 (100%)	+
Magentumore (12)	0 (0%)	---	12 (100%)	+
- Adenokarzinome - diffus(6)	0 (0%)	---	6 (100%)	+
- Adenokarz. - intestinaler Typ (6)	0 (0%)	---	6 (100%)	+

Gastrointestinale Stromatumore (4)	2 (50%)	+	4 (100%)	+
Pankreaskarzinome (10)	0 (0%)	---	10 (100%)	++/+++
Karzellige Nierenkarzinome (10)	0 (0%)	---	10 (100%)	++/+++
Phäochromozytome (10)	0 (0%)	---	0 (0%)	---
Neuroendokrine Tumore (24)	2 (8%)	++	19 (79%)	+
Harnblasenkarzinome (7)	1 (14%)	++	7 (100%)	++/+++
Prostatakarzinome (15)	0 (0%)	---	15 (100%)	++/+++
Mammakarzinome (7)	1 (14%)	++	3 (43%)	++
Cervixkarzinome (6)	0 (0%)	---	6 (100%)	++
Ovarialkarzinome (20)	7 (35%)	+++	20 (100%)	+++
Hämangiome (2)	0 (0%)	---	0 (0%)	---
Sarkome (35)	27 (77%)	++/+++	31 (89%)	++/+++
- Angiosarkome (15)	14 (93%)	++/+++	14 (93%)	+++
- Liposarkome (6)	3 (50%)	++	3 (50%)	++
- Rhabdomyosarkome (3)	2 (67%)	++	3 (100%)	++
- Leiomyosarkome (4)	1 (25%)	+++	4 (100%)	+++
- Pleomorphe Sarkome (3)	3 (100%)	++	3 (100%)	++
- Osteosarkome (4)	4 (100%)	++	4 (100%)	++/+++

¹: Färbeintensität: ---, keine; +, milde; ++, moderate; +++, starke Färbung

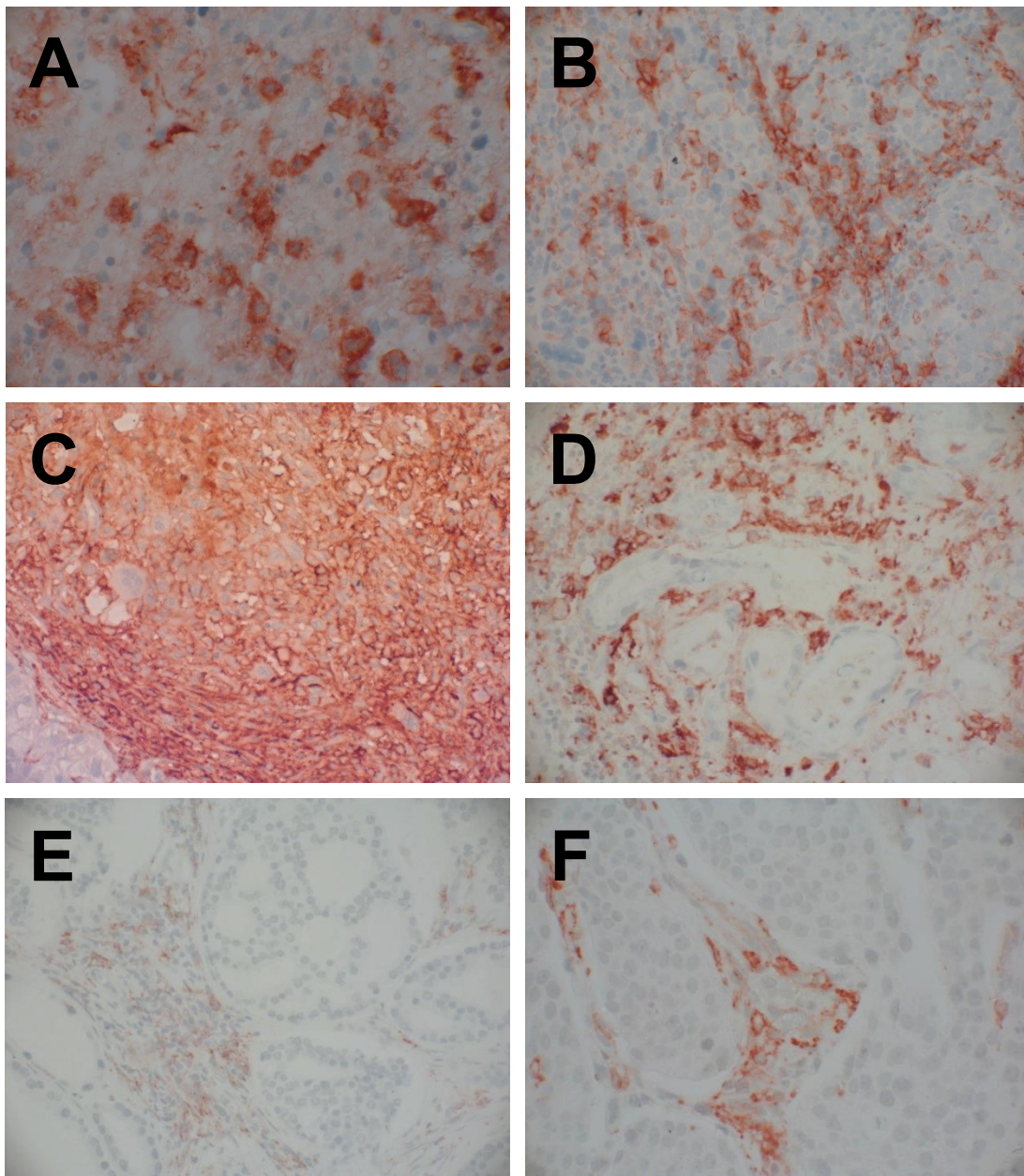


Abbildung 14: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen humanen Tumoren.

A: Glioblastom, B: Ovarialkarzinom, C: hepatozelluläres Karzinom, D: Pankreaskarzinom, E: Prostatakarzinom, F: Harnblasenkarzinom. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x400.

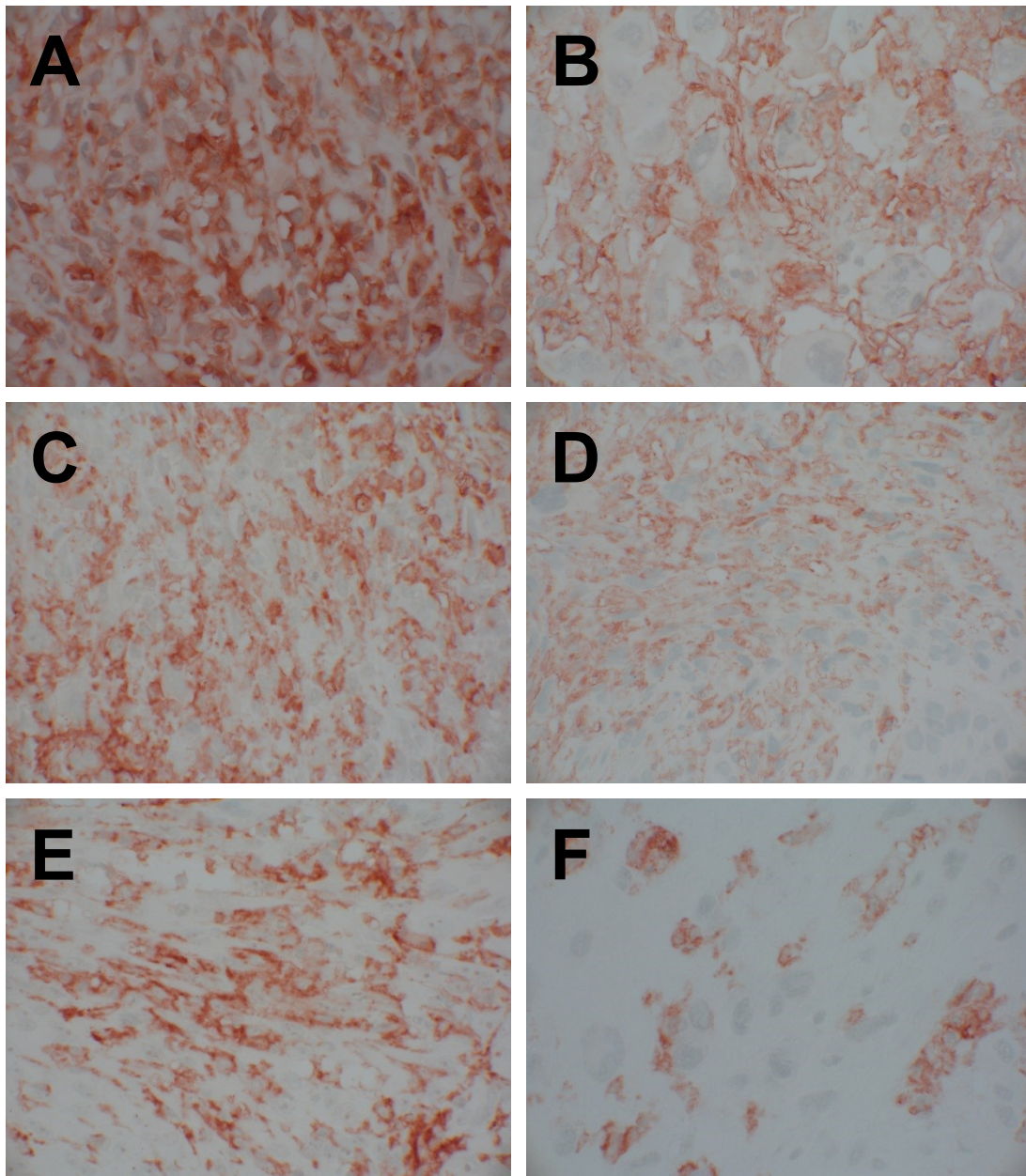


Abbildung 15: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen Sarkom-Entitäten.

A: Angiosarkom, B: Liposarkom, C: Rhabdomyosarkom, D: Leiomyosarkom, E: Pleomorphes Sarkom, F: Osteosarkom. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x630.

5.3.5. Vorbehandlung der Schnitte mit Lambda-Protein-Phosphatase und Peptid-neutralisationen

Aufgrund der in den Western-Blot-Analysen festgestellten Phosphosensitivität des UMB-8, wurde ein Set sowohl an stark als auch an schwach positiven Geweben vor der Immunfärbung einer λ -PP-Behandlung unterzogen. Es zeigte sich jedoch in keinem Fall ein Unterschied in den Färbeergebnissen im Vergleich zu den parallel gefärbten unbehandelten Schnitten, was darauf hinweist, dass in den formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten humanen Präparaten die ETA-Rezeptoren hauptsächlich in der nicht- bzw. in der bereits dephosphorylierten Form vorliegen (Abbildung 16).

Weiterhin wurden einige der stark gefärbten Präparate vergleichend einer Peptidneutralisation unterzogen. Hierzu wurde der Antikörper für zwei Stunden ohne oder in Gegenwart des zur Immunisierung des Kaninchens verwendeten Peptids in einer Konzentration von 10 μ g/ml inkubiert und dann auf die Präparate gegeben. Die Peptidneutralisation führte in allen Fällen zu einer völligen Auslöschung des Immunsignals, wie beispielhaft aus Abbildung 17 zu ersehen ist.

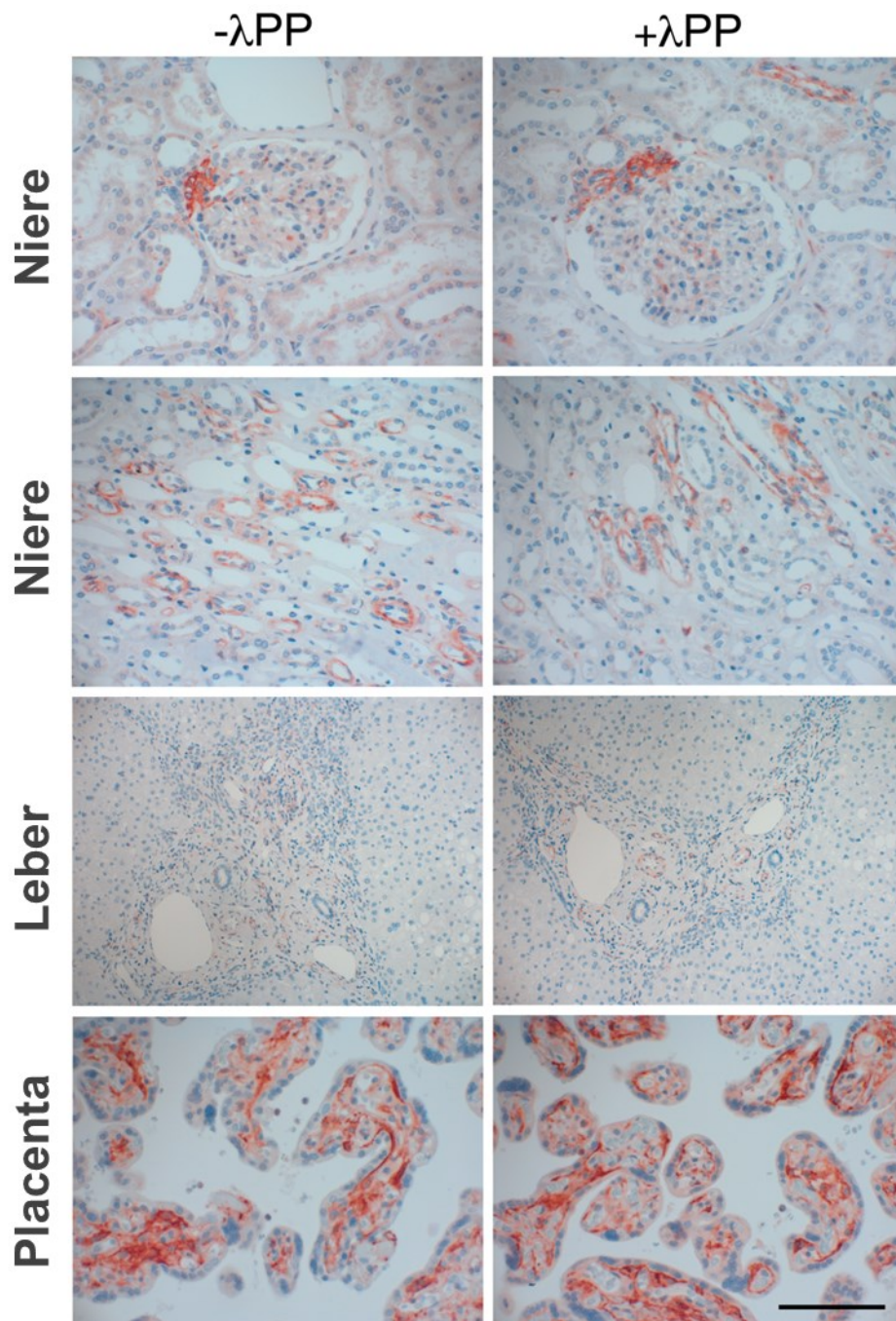


Abbildung 16: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen humanen Normalgeweben entweder ohne vorherige Inkubation der Schnitte mit Lambda-Protein-Phosphatase (-λPP) oder mit vorheriger Behandlung der Schnitte mit Lambda-Protein-Phosphatase zur Dephosphorylierung der Rezeptoren (+λPP). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x400 (Niere, Placenta), x200 (Leber).

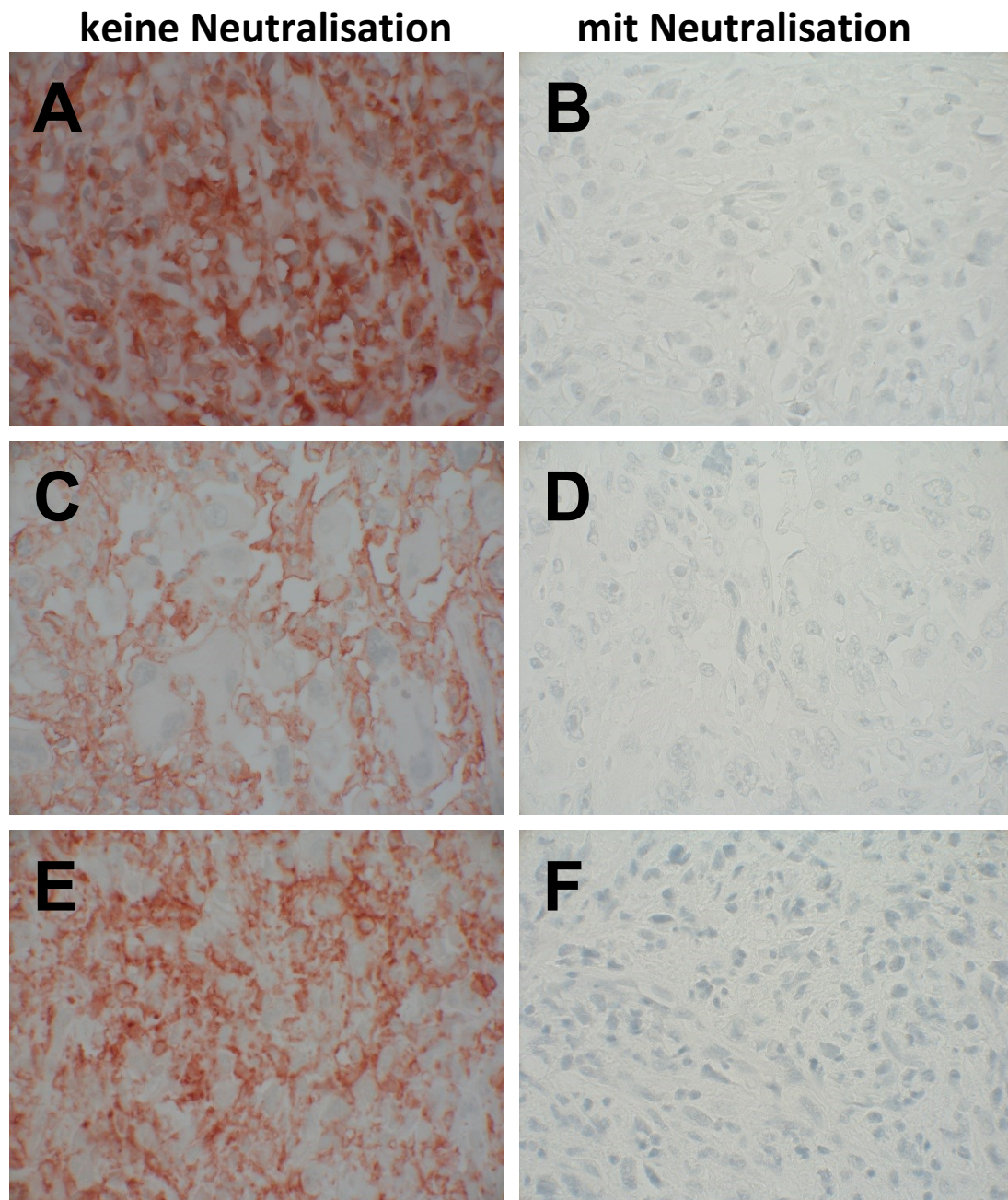


Abbildung 17: ETA-Expression (rotbraune Färbung) in verschiedenen humanen Sarkomen ohne (keine Neutralisation) und mit (mit Neutralisation) vorheriger Inkubation des Antikörpers mit 10 µg/ml des Peptids, welches zur Immunisierung des Kaninchens verwendet worden war. A, B: Angiosarkom, C, D: Liposarkom, E, F: Rhabdomyosarkom. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x630.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den monoklonalen Kaninchen-Anti-Mensch-ETA-Antikörper UMB-8 detailliert zu charakterisieren. Zum Nachweis der Spezifität dienten immunzytochemische Untersuchungen an nativen und stabil mit dem ETA transfizierten HEK-293-Zellen, Western-Blot-Analysen an nativen und stabil mit dem ETA transfizierten HEK-293-Zellen und an normalen Mausgeweben sowie immunhistochemische Färbungen an normalen Ratten-, Maus- und Humangeweben sowie an humanen Tumoren und Peptidneutralisationen.

6.1. Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen

Zur Detektion des humanen ETA wurden HEK-293-Zellen stabil mit dem ETA transfiziert und mit dem UMB-8 immunzytochemisch untersucht.

Nach der Inkubation der HEK-293-ETA-Zellen mit dem UMB-8 war eine starke membranständige Immunfluoreszenz zu beobachten. Somit konnte auf zellulärer Ebene die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typische membranständige Lokalisation des Rezeptors gezeigt werden. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass 1 μ M ET-1 eine geeignete Agonisten-Konzentration ist, um eine Internalisierung des Rezeptors zu zeigen. Diese Agonist-induzierte Internalisierung von Rezeptoren ist ebenfalls typisch für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Drake et al. 2006, Pavlos und Friedman 2017). In den nicht mit dem ETA transfizierten Zellen fand sich dagegen kein Immunsignal, was dafür spricht, dass der UMB-8 nicht mit anderen Proteinen in diesen Zellen kreuzreagiert.

6.2. Western-Blot-Analysen

Der neu entwickelte Antikörper UMB-8 wurde zusätzlich in Western-Blot-Analysen eingesetzt, um einen weiteren Spezifitätsnachweis zu erbringen. Hierfür wurden zum einen native oder stabil mit dem ETA transfizierte HEK-293-Zellen und zum anderen Gewebeproben aus dem Gehirn, dem Rückenmark, dem Herz, der Lunge, der Niere, der Milz und des Colons der Maus untersucht.

Der Anti-ETA-Antikörper UMB-8 detektierte bei den HEK-293-ETA-Zellen eine breite Bande zwischen 60 und 90 kDa. Diese Bande konnte bei den nicht-transfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden, was wiederum für die Spezifität des Antikörpers spricht.

Bei den Western-Blot-Analysen an den Mausgeweben wurden ebenfalls breite Banden zwischen 60 und 90 kDa vor allem beim Herz, aber auch beim Gehirn, bei der Lunge, der Milz und dem Rückenmark, nicht jedoch bei der Niere und beim Colon, nachgewiesen. Obwohl das Molekulargewicht bei Rezeptoren vom Grad der Glykosylierung abhängt, welche abhängig vom untersuchten Organ und der verwendeten Spezies unterschiedlich sein kann

(Moody et al. 2003), lassen sich in der Literatur ähnliche Werte finden (Wendel et al. 2006, Stösser et al. 2010).

Als weiterer Nachweis der Spezifität des UMB-8 wurden Peptidneutralisationen durchgeführt, welche für Western-Blot-Analysen und für immunhistochemische Färbungen einen sehr gut etablierten Ansatz zum Spezifitätsnachweis von Antikörpern darstellen (Frei et al. 2001, Schulz et al. 2004, Schulz et al. 2006, Wendel et al. 2006, Burry 2011, Schulz et al. 2015). Hierbei wird der Antikörper vor dem Einsatz im Western-Blot bzw. der Immunhistochemie mit dem Peptid inkubiert, welches zur Immunisierung des Tiers (in diesem Fall des Kaninchens) verwendet worden war. Der Antikörper bindet an das Peptid, sein spezifisches Antigen, und kann somit nicht mehr mit den entsprechenden Gewebeantigenen reagieren (Burry 2011). Wie zu erwarten, zeigte sich in den Western-Blot-Analysen, die nach der Präabsorption des UMB-8 mit seinem Antigen durchgeführt worden waren, kein Immunsignal mehr. Auch dieser Befund spricht dafür, dass der neu entwickelte monoklonale Anti-ETA-Antikörper UMB-8 spezifisch ist und keine Kreuzreaktionen aufweist.

Der carboxy-terminale Teil des ETA sowohl der Ratte und der Maus als auch des Menschen weist insgesamt 4 mögliche Phosphorylierungsstellen auf. Da der UMB-8 gegen diesen Teil des Rezeptors gerichtet ist, wäre es denkbar, dass die Bindung des Antikörpers durch eine Phosphorylierung des Rezeptors nach Stimulation mit einem Agonisten beeinträchtigt wird. In der Tat zeigte sich in den Western-Blot-Analysen mit zunehmender Zeit nach Stimulation der HEK-293-ETA-Zellen mit ET-1 eine kontinuierliche Abnahme des Immunsignals. Um zu beweisen, dass diese Abnahme des Immunsignals nach Agonist-Stimulation tatsächlich auf einer schlechteren Bindung des Antikörpers aufgrund der Phosphorylierung des Rezeptors beruht, wurden die Membranen für 3 Stunden mit Lambda-Protein-Phosphatase inkubiert, um die Phosphatreste zu entfernen. Wie zu erwarten, wurde hierdurch die Abnahme des Immunsignals verhindert.

Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den Western-Blot-Analysen in den immunzytochemischen Untersuchungen nach 30-minütiger Stimulation der HEK-293-ETA-Zellen mit ET-1 keine Abnahme in der Intensität des Immunsignals verzeichnet werden. Da diese Untersuchungen nicht in Gegenwart eines Phosphatase-Hemmers durchgeführt worden waren, könnte eine Erklärung für diese Diskrepanz zwischen den beiden Methoden sein, dass der Rezeptor nach der initialen Phosphorylierung innerhalb weniger Minuten bereits an oder in der Nähe der Plasmamembran dephosphoryliert wird. Eine solche sehr rasche Dephosphorylierung konnte bereits auch für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gezeigt werden (Pöll et al. 2011, Doll et al. 2012, Petrich et al. 2013, Schulz et al. 2014, Kliwer et al. 2017).

6.3. Immunhistochemische Untersuchungen

6.3.1. Immunhistochemische Untersuchungen an Normalgeweben der Ratte, der Maus und des Menschen

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des neuen monoklonalen Antikörpers UMB-8 erstmals eine umfangreiche Charakterisierung der Expression des ETA in der Ratte, der Maus und im Menschen vorgenommen werden. Obwohl der monoklonale Anti-ETA-Antikörper UMB-8 gegen die carboxy-terminale Sequenz des humanen ETA erzeugt worden war, konnte er auch für die immunhistochemischen Untersuchungen an normalen Ratten- und Mausgeweben verwendet werden, da sich eine Kreuzreaktivität des Antikörpers zeigte, welche aufgrund der Ähnlichkeit der carboxy-terminalen Sequenzen der ETA-Rezeptoren von Ratte, Maus und Mensch zu vermuten gewesen war. Eine zusätzliche Eignung des UMB-8 für den Rezeptornachweis bei der Ratte und bei der Maus erweitert die Einsatzfähigkeit des Antikörpers nicht unerheblich, da viele Untersuchungen in der Grundlagenforschung an diesen beiden Tierspezies erfolgen.

Bei der Analyse der ETA-Expression in den verschiedenen Organen und Geweben zeigten sich die meisten der untersuchten Organe in allen drei Spezies gleichermaßen ETA-negativ. Eine starke Expression des Rezeptors konnte jedoch in allen drei Spezies in den Herzmuskelzellen, in den Kapillaren, in der Muskulatur von Arteriolen, hier insbesondere in den Vasa recta der Nieren und im Vas afferens und Vas efferens der Glomeruli sowie in den Kapillaren der Alveolarsepten, in der Bronchialmuskulatur sowie in Fibroblasten und Fibrozyten nachgewiesen werden. Auch in der menschlichen Placenta konnte eine starke ETA-Positivität verzeichnet werden.

In den wenigen verfügbaren Untersuchungen an Normalgeweben konnte auch in der Literatur eine ETA-Expression im Herzen, in der Niere und in Gefäßen mittels polyklonaler Antikörper, mittels RT-PCR oder mittels Autoradiographie gezeigt werden. So konnten Davenport et al. (1991) mittels Autoradiographie bei der Ratte, dem Schwein und dem Menschen Endothelin-Bindungsstellen in den Glomeruli der Nieren und im Herzen nachweisen, wobei von den Autoren, wie in der vorliegenden Arbeit, eine höhere Dichte an Bindungsstellen in den Herzvorhöfen verzeichnet wurde als in den Ventrikeln. Unter Verwendung hochselektiver ETA- und ETB-Liganden konnten Karet et al. (1993) ebenfalls mittels Autoradiographie eine Expression des ETA in der Muskulatur der Vasa recta der Niere zeigen. Auch die von Wendel et al. (2006) mittels Immunfluoreszenz festgestellte selektive Präsenz des ETA in den Vasa recta der Niere, in den afferenten und efferenten Arteriolen der Glomeruli und in den glomerulären Mesangiumzellen bei der Ratte bestätigt die Färbeergebnisse der vorliegenden Arbeit sehr gut. Die Präsenz des ETA in der menschlichen Ventrikelmuskulatur konnte schließlich von Gärtner et al. (2017) bei Patienten

mit dilatativer Kardiomyopathie mittels Bindungsstudien und RT-PCR ebenfalls bestätigt werden. Eine verstärkte Expression der ET-1/ETA-Achse im Gefäßsystem und in der Niere wird hierbei mit der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen wie arterieller und pulmonalerarterieller Hypertonie (Hynynen und Khalil 2006, Khimji und Rockey 2010, Vignon-Zellweger et al. 2012, Davenport et al. 2016, Thenappan et al. 2018) sowie mit chronischen Nierenerkrankungen wie Glomerulonephritis, diabetischer oder hypertensiver Nephropathie (Neuhofer und Pittrow 2009, Khimji und Rockey 2010, Vignon-Zellweger et al. 2012, Kohan und Barton 2014, Boesen et al. 2015, Davenport et al. 2016) in Zusammenhang gebracht. Bislang werden Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wie Bosentan, Ambrisentan oder Macitentan allerdings nur bei der Therapie der pulmonalerarteriellen Hypertonie eingesetzt (Galiè et al. 2016, Thenappan et al. 2018).

Die Anwesenheit des ETA in der menschlichen Placenta konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden (Wada et al. 1990, Dieber-Rotheneder et al. 2012), wobei eine erhöhte ETA-Expression in der Placenta mit Erkrankungen wie Gestationsdiabetes, Präeklampsie und fetaler Wachstumsretardierung in Verbindung gebracht wird (Dieber-Rotheneder et al. 2012, Granger et al. 2018).

Beim Menschen fand sich in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine deutliche ETA-Expression in den fibroblastischen Retikulumzellen der Milz und der Lymphknoten. Diese Beobachtung konnte bei der Ratte und bei der Maus nicht gemacht werden, was den einzigen Speziesunterschied ausmachen würde. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass die untersuchten menschlichen Lymphknoten und Milzen Tumorpatienten entstammten. Es wäre durchaus denkbar, dass es hier, bedingt durch die Grundkrankheit, zu einer ETA-Expression gekommen war. In die gleiche Richtung geht auch der Befund, dass in den menschlichen zirrhotischen Lebern (neben den Gefäßen) die aktivierten Itozellen eine sehr starke ETA-Positivität zeigten, während das restliche Gewebe wie bei der Ratte und der Maus ETA-negativ war. Eine Positivität von Gefäßen und Itozellen insbesondere von zirrhotischen menschlichen Lebern wird in der Literatur ebenfalls bereits beschrieben (Gondo et al. 1993, Housset et al. 1993, Ling et al. 2012). Angaben zur ETA-Expression in den anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organen und Geweben finden sich in der Literatur bisher nicht.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch keine nennenswerten speziesspezifischen Unterschiede in der ETA-Expression zwischen den Normalgeweben von Ratte, Maus oder Mensch festgestellt werden, was die Eignung der Ratte und der Maus für präklinische Untersuchungen des Endothelin-Systems unterstreicht.

6.3.2. Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumoren

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass der ETA in vielen Tumoren überexprimiert wird, wobei der ET-1/ETA-Achse eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Invasion, Metastasierung, epithelial-mesenchymalen Transition, Immunmodulation, Tumor-Stroma-Interaktion und Neoangiogenese zugeschrieben wird (Bagnato und Rosano 2010, Grant et al. 2003, Khimji und Rockey 2010, Bagnato et al. 2011, Wang und Dashwood 2011, Said und Theodorescu 2012, Rosano et al. 2013, Irani et al. 2014a, Rosano und Bagnato 2016). Doch obwohl die präklinischen Daten, die an einer Vielzahl an Krebszelllinien und an Tiermodellen sowohl mit selektiven ETA- als auch mit nicht-selektiven ETA/ETB-Antagonisten erhoben worden waren, sehr vielversprechend aussahen, waren die Ergebnisse der klinischen Studien eher enttäuschend (Khimji und Rockey 2010, Wang und Dashwood 2011, Kohan et al. 2012, Irani et al. 2014a, Rosano und Bagnato 2016). Ein Grund für diese negativen Ergebnisse könnte sein, dass in den meisten Fällen Patienten in bereits weit fortgeschrittenen, metastasierten Stadien in die Studien eingeschlossen wurden. Es ist jedoch zu erwarten, dass eine Therapie mit ETA-Antagonisten bei nicht-metastasierten Neoplasien effektiver ist als bei bereits sehr fortgeschrittenen Tumorerkrankungen, da zu vermuten ist, dass diese Substanzen insbesondere mit der Proliferation und Metastasierung der Tumore interferieren (Kohan et al. 2012, Said und Theodorescu 2012, Rosano et al. 2013, Rosano und Bagnato 2016). Ein weiterer, sehr wichtiger Punkt, der in zukünftigen klinischen Studien beachtet werden sollte, ist die sorgfältige Auswahl der Patienten. Da offensichtlich nicht alle Tumore eine Überexpression des ETA aufweisen, ist es von großer Bedeutung, nur solche Patienten in die Studien einzuschließen, deren Tumor den ETA für eine entsprechende Therapie auch in ausreichender Höhe exprimiert. Um herauszufinden, ob ein Patient ein guter Kandidat für eine ETA-basierte Tumorthherapie ist, ist es daher zwingend notwendig, zuvor den ETA-Expressionsstatus des Tumors z.B. mittels Immunhistochemie, Autoradiographie oder qRT-PCR zu bestimmen (Reubi und Waser 2003, Schulz et al. 2004). Hierbei ist die immunhistochemische Untersuchung von klarem Vorteil, da sie relativ schnell und unkompliziert auch in der pathologischen Routinediagnostik zu bewerkstelligen ist und dabei trotzdem verlässlich eine Rezeptor-Überexpression aufzeigt (Schulz et al. 2004). Eine zuverlässige Immunhistochemie ist jedoch wiederum maßgeblich von der Verfügbarkeit von entsprechenden hochspezifischen Antikörpern abhängig. Allerdings sind alle bisher verfügbaren (polyklonalen) Anti-ETA-Antikörper lediglich in der Lage, eine zytoplasmatische (und nukleäre) Färbung dieses membrangebundenen Rezeptors zu erzeugen. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den neu synthetisierten monoklonalen Antikörper UMB-8, mit dem es nun erstmals möglich ist, die Membranständigkeit der Rezeptoren aufzuzeigen, an einer großen Serie von humanen Tumoren auf seine Eignung in der pathologischen Routinediagnostik hin zu untersuchen.

Dabei sollte außerdem ein Rezeptorexpressionsprofil der verschiedenen Tumorentitäten erstellt werden, um für zukünftige Untersuchungen einen Hinweis darauf zu geben, bei welchen Tumorerkrankungen ein ETA-basierter therapeutischer Ansatz möglicherweise am ehesten sinnvoll erscheint.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben eine starke ETA-Positivität mit einer hohen Prävalenz insbesondere in Glioblastomen, in Schilddrüsenkarzinomen, in Ovarialkarzinomen und in allen untersuchten Sarkom-Entitäten. Hierbei wiesen sowohl die Tumorzellen selber als auch die Tumorgefäße eine sehr starke, membranständige ETA-Expression auf. Die beiden untersuchten (gutartigen) Hämangiome waren dagegen komplett ETA-negativ.

Eine Expression sowohl von ET-1 als auch der mRNA des ETA- und des ETB-Rezeptors konnte in der Literatur bereits mittels RT-PCR an der **Glioblastom**-Zelllinie T98G nachgewiesen werden (Sone et al. 2000). Auch in Western-Blot-Analysen, die mit einem polyklonalen Antikörper durchgeführt worden waren, konnte an einer anderen Glioblastom-Zelllinie, U251, eine ET-1-, ETA- und ETB-Expression gezeigt werden. Weiterhin führte eine Stimulation dieser Zellen mit ET-1 zu einer verstärkten migratorischen Aktivität, zu einer vermehrten Expression der Matrix-Metalloproteinasen 9 und 13 und zu einer erhöhten Akkumulation von phospho-c-Jun im Zellkern (Hsieh et al. 2014). Basierend auf den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde mittlerweile eine größere Anzahl von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade immunhistochemisch mit dem UMB-8 auf eine Expression des ETA hin untersucht (Lange et al. 2018). Dabei zeigte sich eine Expression des ETA in 50% der Tumore, wobei die ETA-Positivität der Neoplasien mit steigendem WHO-Grad zunahm. Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen konnte in dieser Untersuchung eine Expression des ETA sowohl auf den Tumorzellen als auch insbesondere auf den tumorversorgenden Kapillaren festgestellt werden, wobei das Ausmaß der ETA-Positivität der Kapillaren mit der Proliferationsrate der Tumore korrelierte. Da Glioblastome eine ausgesprochen schlechte Prognose aufweisen und es bislang keine ausreichenden Therapieoptionen für die betroffenen Patienten gibt, sollte die Möglichkeit einer ETA-basierten Therapie (evtl. sogar auf eine gezielte Beeinflussung der Tumorgefäße hin fokussiert) auf jeden Fall weiter verfolgt und die bisher erhobenen Befunde z.B. durch entsprechende Untersuchungen an Tiermodellen noch vervollständigt werden. Hier wäre insbesondere eine Kombination mit „klassischen“ Chemotherapeutika lohnend.

Auch in **Schilddrüsenkarzinomen** konnte durch andere Arbeitsgruppen schon eine ETA-Expression gezeigt werden. So wurde durch Irani et al. (2014b) in einer großen Serie an papillären Schilddrüsenkarzinomen mittels Immunhistochemie unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers in 95% der Tumore eine starke eine ETA-Expression

nachgewiesen. In der parallel durchgeführten RT-PCR fanden sich zusätzlich eine höhere ETA-Expression in den Lymphknoten-Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren sowie eine Zunahme der ETA-Präsenz mit steigender Tumorgroße. Zuvor konnte durch eine andere Arbeitsgruppe bereits eine erhöhte ETA-mRNA-Expression in papillären Schilddrüsenkarzinomen festgestellt werden (Donckier et al. 2003). Auch in Zelllinien von papillären oder follikulären Schilddrüsenkarzinomen konnte der ETA mittels RT-PCR oder Western-Blot bereits nachgewiesen werden, wobei eine Behandlung der Zellen mit dem ETA-Antagonisten Atrasentan antiproliferative Effekte zeigte (Donckier et al. 2007). Die Möglichkeit einer ETA-basierten Bildgebung wurde ebenfalls schon in einem Tiermodell getestet. Hierbei gelang es den Autoren in Nude-Mäusen, welche eine subkutane Implantation der follikulären, den ETA-exprimierenden Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie K1 erhalten hatten, den so entstandenen Tumor durch eine PET/CT mit Hilfe eines ¹⁸F-markierten spezifischen ETA-Liganden erfolgreich nachzuweisen (Maschauer et al. 2013). Auch hier wären weiterführende Untersuchungen zum therapeutischen Effekt von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten z.B. in einem entsprechenden Schilddrüsenkarzinom-Tiermodell von Interesse.

In Bezug auf die ETA-Expression in **hepatozellulären Karzinomen** (HCC) existiert bereits eine immunhistochemische Studie an einer größeren Serie von Chinesischen Patienten (Cong et al. 2016). Die Autoren konnten eine ETA-Positivität in 75% der Tumore zeigen, wobei zusätzlich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Umfang der ETA-Expression und dem Tumorstadium und dem Ausmaß der Angioinvasion nachweisbar war. Leider ist aus der entsprechenden Veröffentlichung die Art des verwendeten Antikörpers nicht ersichtlich. Die Untersuchungen wurden durch Western-Blot- und RT-PCR-Analysen sowie durch Experimente an verschiedenen HCC-Zelllinien komplettiert. In den Zellexperimenten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine ETA-vermittelte Stimulation der Zellen mit ET-1 deren Migrations- und Invasionsfähigkeit sowie die Expression von Metalloproteinase 3 und von ERK1/2 und AKT erhöht. In einer weiteren Chinesischen Studie konnte die proliferations- und migrationsfördernde Wirkung von ET-1 anhand einer anderen Zelllinie bestätigt und mittels RT-PCR eine erhöhte ET-1-Expression sowohl in dieser Zelllinie als auch in humanen HCC-Präparaten festgestellt werden (Shi et al. 2017). Weiterführende tierexperimentelle Untersuchungen wären daher auch hier interessant.

Wie in der vorliegenden Arbeit konnte auch in der Literatur in **Ovarialkarzinomen** sowohl beim Menschen (Bagnato et al. 1999) als auch beim Hund (Borzacchiello et al. 2010) eine immunhistochemische Färbung sowohl der Tumorzellen als auch der Tumorgefäße nachgewiesen werden, wobei (im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit) durch die verwendeten polyklonalen Antikörper nur eine zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen, nicht jedoch eine Membranständigkeit der Rezeptorexpression gezeigt werden konnte. Ebenso konnte

mittels Autoradiographie und in-situ-Hybridisierung an menschlichen Ovarialkarzinom-Präparaten eine ETA-Expression sowohl in den Tumoren als auch insbesondere auf den neugebildeten Tumorgefäßen gezeigt werden (Salani et al. 2000). Interessanterweise wurde in diesen Untersuchungen zusätzlich eine starke Korrelation zwischen der Höhe der ET-1-Expression und dem Ausmaß der Neovaskularisierung der Tumore festgestellt. Dies legt eine speziell gegen die ET-1/ETA-vermittelte Neovaskularisierung der Ovarialkarzinome gerichtete Therapie nahe. Entsprechend konnte in einem Mausmodell nach intraperitonealer Injektion der Zytostatika-resistenten Ovarialkarzinom-Zelllinie HeyA8-MDR nach kombinierter Therapie mit Macitentan plus Paclitaxel bzw. Cisplatin zunächst eine Apoptose der tumorassoziierten Endothelzellen, die von einer Apoptose der umgebenden Tumorzellen gefolgt war, beobachtet werden. Die Therapie mit den jeweiligen Einzelsubstanzen hatte dagegen keinen Effekt (Kim et al. 2012). Weiterführende Untersuchungen wären daher auch hier interessant.

Untersuchungen zur ETA-Expression in menschlichen **Sarkomen** oder in entsprechenden Zelllinien existieren in der Literatur, wohl aufgrund der Seltenheit dieser Tumore, bislang nicht. Es konnte jedoch mittels Western-Blot und Immunhistochemie unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers bzw. mittels PCR eine ETA-Expression in Osteosarkomen bzw. Angiosarkomen von Hunden, bei denen diese Tumore offensichtlich vergleichsweise häufig auftreten, bzw. in den entsprechenden Zelllinien nachgewiesen werden (Neumann et al. 2015, Fukumoto et al. 2016). Auch in diesen Zelllinien hatte eine ETA-Blockade eine verminderte Migrations- und Proliferationsaktivität zur Folge. Da Sarkome, ebenso wie Glioblastome, eine sehr schlechte Prognose aufweisen und da für diese Tumorentitäten bisher keine befriedigenden Behandlungsmöglichkeiten existieren, könnte eine ETA-basierte Therapie mittels Bosentan, Ambrisentan oder Macitentan oder eine Peptid-vermittelte Radiorezeptor-Therapie (PRRT) unter Verwendung von radioaktiv markierten ETA-Liganden für die entsprechenden Patienten eine interessante, neue Option darstellen, die auf jeden Fall weiter verfolgt werden sollte.

Im Gegensatz zu den obengenannten Tumoren war in der vorliegenden Untersuchung in allen anderen untersuchten Tumorentitäten die Prävalenz der ETA-Expression nur gering und/oder das Expressionslevel nur sehr niedrig. Diese Ergebnisse kontrastieren teilweise mit den Literaturangaben (siehe unten), stehen jedoch in Einklang mit den enttäuschenden Ergebnissen der klinischen Studien, die an diesen Tumorentitäten erhoben wurden (Khimji und Rockey 2010, Wang und Dashwood 2011, Kohan et al. 2012, Irani et al. 2014a, Rosano und Bagnato 2016). Auf der anderen Seite wurde in der vorliegenden Untersuchung in vielen dieser Tumorentitäten eine starke ETA-Expression im Tumorstroma (z.B. auf Fibroblasten und Fibrozyten) und insbesondere auf den tumorversorgenden Kapillaren gefunden, eine

Beobachtung, die auch von vielen anderen Autoren gemacht werden konnte. In diesen Fällen wäre daher eine indirekte, auf die Tumorgefäße und auf die Stroma-Tumor-Interaktion abzielende Therapie (auch in Kombination mit einer „klassischen“ Chemotherapie) durchaus denkbar. Weiterführende Untersuchungen sollten deshalb hier ansetzen.

Von den sieben in der vorliegenden Untersuchung untersuchten GH-produzierenden **Hypophysenadenomen** waren nur in einem Fall die Tumorzellen (wenn auch stark) ETA-positiv, jedoch zeigte sich in allen Tumoren eine starke ETA-Expression im Tumorstroma. In der Literatur findet sich bislang nur ein einziger Hinweis auf eine Expression des ETA und des ETB in der Hypophyse, welcher mit Hilfe von autoradiographischen Untersuchungen und mittels RT-PCR an Ratten erhoben wurde (Harada et al. 2002). Da selbst bei inoperablen Hypophysentumoren mit den verfügbaren Somatostatin-Analoga wie Octreotid, Lanreotid oder Pasireotid eine sehr effektive Therapieoption verfügbar ist (Günther et al. 2018), würde eine pharmakologische Beeinflussung des ETA aufgrund der geringen Expression keine echte Therapiealternative darstellen, so dass weiterführende Untersuchungen hier wahrscheinlich nicht zielführend sind.

Auch von den 15 in der vorliegenden Arbeit untersuchten **Lungentumoren** zeigte nur ein Adenokarzinom eine mäßige ETA-Expression. In allen Tumoren wies zudem auch das Stroma nur eine geringe ETA-Positivität auf, so dass eine ETA-basierte Therapie aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als nicht sinnvoll erscheint. Dies wird durch Befunde aus der Literatur an humanen Tumorpräparaten und an verschiedenen Zelllinien aus kleinzelligen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen unterstützt. So wurde in immunhistochemischen Untersuchungen mittels eines polyklonalen Antikörpers bei den Adenokarzinomen der Lunge kein Unterschied bzw. bei den Plattenepithelkarzinomen und bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen sogar ein niedrigeres ETA-Expressionslevel als im umgebenden normalen Lungengewebe festgestellt (Blouquit-Laye et al. 2010). Von einer anderen Autorengruppe wird aufgrund der Ergebnisse, die von ihnen mittels RT-PCR, ELISA und Immunzytochemie an den verschiedensten Lungenkarzinom-Zelllinien erzeugt wurden, schließlich sogar geschlussfolgert, dass es offensichtlich keinen funktionellen ET-Rezeptor in diesen Zellen gibt, über den durch ET-1 auf autokrinem Weg ein Wachstum ausgelöst werden könnte (Ahmed et al. 2000).

Bei den 12 analysierten **Magentumoren** konnte in der vorliegenden Arbeit in keinem Fall eine ETA-Expression im Tumor verzeichnet werden. Auch im Stroma dieser Tumore zeigte sich keine nennenswerte ETA-Positivität. Lediglich bei den vier zusätzlich analysierten Gastrointestinalen Stromatumoren fand sich in der Hälfte der Fälle eine leichte ETA-Expression, aber auch hier war das Stroma der Tumore nur gering positiv. Daher erscheint auch hier eine ETA-basierte Therapie nicht sinnvoll. Die vorliegenden Befunde stehen allerdings in Widerspruch zu den Ergebnissen, die in vitro und in vivo im Tiermodell mit einer

hochaggressiven Magenkarzinom-Zelllinie erhoben wurden (Fukui et al. 2007). Hier konnte durch den spezifischen ETA-Antagonisten YM598 eine Reduktion der Proliferationsrate der Zellen in vitro und eine Verminderung des Tumorwachstums und der Metastasierung in vivo gezeigt werden. Auch wies diese Zelllinie im Vergleich zu einer weniger aggressiven Zelllinie ein höheres ETA-Expressionslevel auf.

Keine ETA-Expression zeigte sich auch in den zehn in der vorliegenden Arbeit untersuchten **Pankreaskarzinomen**. Allerdings konnte bei dieser Tumorentität im Stroma eine mäßig bis starke ETA-Expression verzeichnet werden, was eine indirekte Therapie dieser Tumore über das Stroma und die versorgenden Blutgefäße möglich machen würde. In der Literatur lassen sich bisher keine Untersuchungen zur Präsenz des ETA in Pankreaskarzinomen oder in entsprechenden Zelllinien finden.

Auch bei den zehn untersuchten klarzelligen **Nierenkarzinomen**, dem häufigsten Karzinomtyp der Niere, konnte keine ETA-Expression in den Tumorzellen, jedoch bei allen Tumoren eine mäßig bis starke Positivität des Stromas festgestellt werden, was auch hier eine indirekte Therapie der Karzinome ermöglichen würde. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu einer größeren immunhistochemischen Tissue-Microarray-Studie in der Literatur, in der mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern an 183 klarzelligen und papillären Nierenkarzinomen die Expression von ET-1, ETA und ETB untersucht wurde (Herrmann et al. 2007). In dieser Studie waren 84% der Tumore ETA-positiv, wobei allerdings 69% der positiven Nierenkarzinome nur eine schwache ETA-Expression aufwiesen und nur ein Tumor stark gefärbt war. Angaben zu einer möglichen Präsenz des ETA auch im Tumorstroma finden sich in der entsprechenden Veröffentlichung nicht. Auch in einer Untersuchung an verschiedenen Nierenkarzinom-Zelllinien konnte eine ETA-mRNA-Expression in allen untersuchten Zelllinien festgestellt werden (Pflug et al. 2007). Eine Stimulation von Paclitaxel-vorbehandelten Zellen mit ET-1 führte zudem zu einem verbesserten Überleben der Zellen, ein Effekt, der durch den selektiven ETA-Antagonisten BA1119 aufgehoben werden konnte (Pflug et al. 2007). Weitere Untersuchungen sind hier notwendig, um diese Diskrepanzen zur vorliegenden Arbeit aufzuklären.

Die in der vorliegenden Untersuchung analysierten **Phäochromozytome** waren komplett ETA-negativ. Dieser Befund steht ebenfalls in Widerspruch zu Daten aus der Literatur (Watanabe et al. 1997). Hier konnten die Autoren mit Hilfe von selbst erzeugten polyklonalen Antikörpern den ETA in 66% der Phäochromozytome und in 73% der Paragangliome nachweisen. Allerdings war die ETA-Immunreaktivität in den positiven Präparaten nur in vereinzelt Zellclustern aufzufinden und vorwiegend nukleär ausgeprägt, was Zweifel an der Spezifität des Antikörpers aufkommen lässt.

Von den 24 in der vorliegenden Arbeit untersuchten **neuroendokrinen Tumoren** wiesen nur zwei eine mäßige Präsenz des ETA auf. Auch im Stroma war die ETA-Expression, wenn

vorhanden, nur gering ausgeprägt. Vergleichbare Studien und auch Untersuchungen an entsprechenden Zelllinien lassen sich in der Literatur bisher nicht finden. Da wie bei den Hypophysenadenomen mit den verfügbaren Somatostatin-Analoga wie Octreotid, Lanreotid oder Pasireotid eine sehr effektive Therapieoption für selbst inoperable neuroendokrine Tumore verfügbar ist (Günther et al. 2018), würde den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge der ETA als therapeutische Zielstruktur aufgrund der geringen Expression keine echte Alternative zu den Somatostatinrezeptoren darstellen.

Bei den analysierten sieben **Harnblasenkarzinomen** zeigte nur ein Tumor eine mäßige ETA-Positivität. Sehr ausgeprägt war dagegen die ETA-Expression in allen Fällen im Tumorstroma, was wiederum für eine indirekte therapeutische Angriffsmöglichkeit dieser Tumore über den ETA sprechen würde. Auch hierzu gibt es widersprüchliche Daten in der Literatur. In einer 154 Fälle umfassenden Tissue-Microarray-Studie konnte mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers aus dem Schaf in 93% der Harnblasenkarzinome eine ETA-Expression nachgewiesen werden (Eltze et al. 2009). Das Immunsignal war ausschließlich zytoplasmatisch nachweisbar; über eine mögliche Färbung der Tumorgefäße oder des Stromas wurde in der Veröffentlichung nicht berichtet. Allerdings war das beobachtete Expressionslevel nur sehr gering. Anders als in allen anderen Untersuchungen an zahlreichen verschiedenen Tumorentitäten zeigte sich in der Studie von Eltze et al. (2009) zudem ein besseres Überleben der Patienten mit ETA-positiven als mit ETA-negativen Tumoren, was auch hier Zweifel an der Spezifität des Antikörpers aufkommen lässt. In einer neueren, 194 Fälle umfassenden Tissue-Microarray-Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe (Said et al. 2014) konnte dagegen ein negativer Zusammenhang zwischen der ET-1-Expression in den Harnblasenkarzinomen und dem Überleben der Patienten beobachtet werden. Die Expression des ETA war in der Studie von Said et al. (2014) leider nicht erfasst worden. Allerdings konnten die Autoren in zusätzlich durchgeführten in-vitro-Untersuchungen an Maus-Harnblasenkarzinom-Zelllinien nach Depletion des ET-1 und in Tiermodellen nach pharmakologischer Blockade des ETA zeigen, dass sowohl die ET-1-Expression als auch die Aktivität des ETA eine notwendige Voraussetzung für die Proliferation der Tumorzellen und für die metastatische Kolonisation der Lunge sind. Die Autoren beobachteten aber auch, dass die Metastasierung der Harnblasenkarzinomzellen in die Lunge von einer vorherigen Invasion von Makrophagen begleitet wurde und auch von dieser abhing, während die ET-1- und ETA-Expression im Tumor selbst für das Wachstum des Primärtumors und die Metastasierung nicht von Bedeutung war. Dies würde die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit zumindest teilweise stützen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben auch bei den **Prostatakarzinomen** in allen 15 Fällen eine komplette Negativität der Tumore, jedoch wiederum eine deutliche Expression des ETA im Tumorstroma. Im Gegensatz dazu konnte in einer 51 Fälle

umfassenden immunhistochemischen Studie, die unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers durchgeführt worden war (Gohji et al. 2001), in 71% der Fälle eine ETA-Expression in den Tumoren festgestellt werden. In 51% der Fälle wurde sogar eine starke Positivität verzeichnet. Weiterhin konnten die Autoren einen positiven Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der ETA-Expression in den Tumoren und dem Gleason-Score sowie eine höhere ETA-Expression bei einer über das Organ hinausgehenden Ausbreitung des Tumors oder bei Knochenmetastasen beobachten. In einer weiteren Untersuchung wurden 120 Prostatakarzinomfälle mit Hilfe eines ebenfalls polyklonalen Antikörpers immunhistochemisch gefärbt (Godara et al. 2007). Dabei zeigte sich der ETA in 72% der Tumore positiv. Auch hier korrelierte das Ausmaß der ETA-Expression mit dem Tumorstadium und dem Grading und einer negativen Prognose für die Patienten. Basierend auf diesen Befunden wurden (wohl auch aufgrund der Häufigkeit des Prostatakarzinoms) bereits zahlreiche klinische Studien mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten an Prostatakarzinompatienten, speziell mit Atrasentan und Zibotentan, durchgeführt, die 2015 in einer Meta-Analyse zusammengefasst wurden (Qiao et al. 2015). Dabei zeigte sich, dass weder eine Behandlung mit Atrasentan noch mit Zibotentan in der Lage ist, das progressionsfreie oder das Gesamtüberleben der Patienten im Vergleich zur Placebogruppe zu erhöhen. Die Analyse ergab aber auch bei den mit Atrasentan im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Patienten signifikant niedrigere PSA-Werte und signifikant verringerte Knochenschmerzen. Auch war bei diesen Patienten der Anstieg der PSA-Werte und der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase im weiteren Verlauf der Erkrankung verzögert. Diese Beobachtung wird auch durch eine andere, nicht in der Meta-Analyse erfasste Studie gestützt, in der gezielt der Einfluss von Atrasentan auf Marker des Knochenmetabolismus bei Prostatakarzinompatienten untersucht wurde (Nelson et al. 2003b). Alles in allem weisen sowohl die Befunde der vorliegenden Arbeit als auch die der Meta-Analyse darauf hin, dass, wie bei den Harnblasentumoren, ETA-Antagonisten, unter anderem durch eine Modulation der Tumor-Stroma-Interaktion als auch des Immunsystems (dazu zählen im weiteren Sinn auch Osteoklasten) in der Lage sind, die Tumorprogression und -Metastasierung zu verlangsamen. Die zahlreichen negativen Studien, speziell mit Prostatakarzinom-Patienten, zeigen aber auch, dass es bei vielen Tumorentitäten wahrscheinlich keinen Sinn macht, diese Substanzen erst in fortgeschrittenen, metastasierten Stadien zu testen.

Von den sieben in der vorliegenden Arbeit untersuchten **Mammakarzinomen** wies lediglich ein Tumor eine mäßige ETA-Positivität auf. Bei drei der Neoplasien zeigte das Stroma eine ebenfalls mäßige ETA-Expression. In einer mit einem polyklonalen Antikörper vom Schaf durchgeführten immunhistochemischen Analyse einer Serie von 159 Tumorpräparaten (Wülfing et al. 2003) konnte dagegen eine mäßige bis hohe zytoplasmatische ETA-

Expression in 46,5% der Fälle ermittelt werden. In 53,5% der Fälle waren die Tumore gar nicht oder nur gering gefärbt. Zusätzlich wurde in den ETA-positiven Tumoren häufig auch eine ETA-Expression im Stroma beobachtet. Bei der Korrelation der Färbeergebnisse mit den klinikopathologischen Daten konnten die Autoren außerdem einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der ETA-Expression in den Tumoren und einer schlechten histologischen Differenzierung, einer lymphovaskulären Infiltration, der Anwesenheit von Fernmetastasen, einer Her-2/neu- oder Estrogenrezeptor-Positivität und einem erhöhten Risiko für ein lokoregionales Rezidiv feststellen (Wülfing et al. 2003). In einer darauffolgenden Tissue-Microarray-Untersuchung mit dem gleichen Antikörper (Wülfing et al. 2004a), die 200 Fälle umfasste, wurde eine mäßige bis starke ETA-Expression in 43,7% der Tumore beobachtet. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen der ET-1-, ETA-, ETB- und der VEGF-Expression sowie der Gefäßdichte der Tumore verzeichnet werden. In einer weiteren Studie konnte die Autorengruppe eine ETA-Positivität des Tumors als unabhängigen prognostischen Faktor für ein schlechteres Ansprechen der Patientinnen auf eine Zytostatika-Therapie mit Epirubicin und Cyclophosphamid ermitteln (Wülfing et al. 2004b). In dieser Studie waren 35% der Tumore mäßig bis stark positiv, wobei in diesen Fällen wiederum häufig eine ETA-Expression im Stroma verzeichnet wurde. Schließlich konnte von der Autorengruppe anhand des bereits 2004 erstellten Tissue-Microarrays eine Korrelation zwischen der HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α) und der ET-1- oder ETA-Expression in den Tumoren gezeigt werden (Smollich et al. 2008). In parallel durchgeführten in-vitro-Untersuchungen an Mammakarzinom-Zelllinien fand sich ein Zusammenhang zwischen einer Hypoxie und der ET-1-Sekretion sowie der Invasionsfähigkeit der Zellen. Die Hypoxie-induzierte Invasionsfähigkeit der Zellen konnte dabei durch Atrasentan komplett blockiert werden (Smollich et al. 2008). Weitere Untersuchungen in vitro und an Tiermodellen zeigten zuletzt einen additiven Effekt der selektiven ETA-Antagonisten Atrasentan und Zibotentan mit Trastuzumab oder verschiedenen Aromatase-Inhibitoren (Fischgräbe et al. 2009, Smollich et al. 2010).

In keinem der sechs in der vorliegenden Arbeit analysierten **Cervixkarzinome** konnte eine ETA-Expression festgestellt werden. Allerdings konnte in allen Fällen eine mäßige Positivität des Stromas ausgemacht werden. In der Literatur konnte eine ETA-mRNA-Expression und ET-1-Sekretion ausschließlich in mit dem humanen Papillomvirus (HPV) infizierten Cervixkarzinomzelllinien, nicht jedoch in nicht-infizierten Zelllinien nachgewiesen werden (Venuti et al. 2000, Cirilli et al. 2004). Weiterhin konnte das Wachstum der HPV-positiven Zellen durch eine Stimulation mit ET-1 erhöht und durch eine ETA-Blockade reduziert werden (Venuti et al. 2000, Cirilli et al. 2004). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in einem entsprechenden Tumormodell durch die Behandlung der Tiere mit Atrasentan das Wachstum der HPV-positiven Cervixkarzinom-Xenografts und die

Neoangiogenese deutlich vermindert. Hierbei zeigte Atrasentan additive Effekte zu Paclitaxel (Bagnato et al. 2002). Bei den sechs Cervixkarzinom-Fällen der vorliegenden Arbeit war der HPV-Status nicht bekannt. Umfangreichere (immunhistochemische) Untersuchungen mit einer deutlich größeren Anzahl an HPV-positiven und -negativen menschlichen Cervixkarzinom-Präparaten sind daher notwendig, um die bisher erzielten Ergebnisse einordnen zu können.

6.3.3. Einfluss einer Vorbehandlung der Schnitte mit Lambda-Protein-Phosphatase und Peptidneutralisationen

Da in den Western-Blot-Analysen eine Phosphosensitivität des UMB-8 nachweisbar war, wurde zusätzlich überprüft, ob eine mögliche Phosphorylierung der Rezeptoren auch zu einer Verminderung des Immunsignals in den immunhistochemischen Färbungen führt. Hierzu wurde eine Serie an positiven Präparaten parallel mit und ohne Lambda-Protein-Phosphatase über 3 Stunden inkubiert, bevor der Primärantikörper zugesetzt wurde. Hierbei wurde in keinem Fall ein Unterschied zwischen den Kontroll- und den mit Lambda-Protein-Phosphatase behandelten Schnitten sowohl in der Intensität des Immunsignals als auch im Färbemuster gesehen. Daraus kann geschlossen werden, dass unter Routinebedingungen die Zeitspanne zwischen der chirurgischen Entfernung der Gewebe und deren Fixation in Formalin lange genug ist, um zu einer Dephosphorylierung von (zuvor möglicherweise phosphorylierten) Rezeptoren zu führen. Eine vorherige Behandlung der Schnitte mit Lambda-Phosphatase ist daher bei pathologischen und (da der Prozess der Dephosphorylierung bereits innerhalb weniger Minuten abläuft) auch bei tierexperimentellen Routinepräparaten nicht notwendig.

Um einen weiteren Spezifitätsnachweis des UMB-8 auch für die Immunhistochemie zu liefern wurde anhand einiger positiv gefärbter Präparate eine Peptidneutralisation durchgeführt, wobei der Antikörper parallel über 2 Stunden ohne bzw. in Gegenwart von 10 µg/ml des Peptids, das zur Immunisierung des Kaninchens eingesetzt worden war, inkubiert wurde, bevor der Antikörper bzw. das Antikörper/Peptid-Gemisch auf die Präparate gegeben wurde. Hierbei zeigte sich in allen Fällen eine komplette Auslöschung des Immunsignals durch das Peptid.

7. Schlussfolgerungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Charakterisierung des neu entwickelten monoklonalen Kaninchen-Anti-Mensch-ETA-Antikörpers UMB-8. Der Spezifitätsnachweis wurde mittels immunzytochemischer Untersuchungen an stabil transfizierten HEK-293-Zellen, Western-Blot-Analysen, immunhistochemischen Färbungen an normalen Ratten-, Maus- und Humangeweben und an humanen Tumorgeweben sowie mit Hilfe von Peptidneutralisationen erbracht. In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass der Antikörper sich für Untersuchungen an den ETA tragenden Zelllinien und für die Rezeptorsuche in Paraffinschnitten eignet. Der Antikörper ist für Untersuchungen an Zellen und Zelllinien, Western-Blot-Analysen aus Zellen, Zelllinien und Geweben sowie für immunhistochemischen Untersuchungen an in Paraffinschnitten eingebetteten Geweben, wie sie bei histopathologischen Routine-Untersuchungen standardmäßig angewendet werden, ohne Einschränkungen zu empfehlen.

Mit der Entwicklung des Antikörpers ist es nun erstmals möglich geworden, den ETA in humanen Normal- und Tumorgeweben zuverlässig und spezifisch darzustellen. Auf diese Weise konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein erstes Rezeptorexpressionsprofil von einer großen Serie an menschlichen Tumoren erstellt werden, auf dessen Basis in der Arbeitsgruppe bereits weiterführende Untersuchungen durchgeführt wurden. Es zeigte sich eine hohe Expression des Rezeptors in Glioblastomen, Schilddrüsenkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und in allen untersuchten Sarkom-Entitäten, aber auch im Stroma vieler anderer Tumorarten, was neue therapeutische Optionen für die entsprechenden Patienten eröffnen könnte. Hier sollten auf jeden Fall weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Zusätzlich kann der neu entwickelte monoklonale Antikörper UMB-8 aufgrund der Sequenzähnlichkeit des antigenen carboxy-terminalen Endes der Rezeptoren von Mensch, Maus und Ratte für die Grundlagenforschung z.B. an Tiermodellen sehr dienlich sein. Aufgrund seiner Phosphosensitivität eignet sich der UMB-8 außerdem sehr gut für die Aufklärung der Phosphorylierung und des intrazellulären Traffickings des ETA.

Mit dem vorliegenden monoklonalen Antikörper ist es nun möglich, Antikörper gegen den ETA in unbegrenzter Menge und in stets gleichbleibender Qualität und Spezifität bereitzustellen, wodurch vergleichbar gute und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können. Diese Möglichkeit war durch die bisher erhältlichen polyklonalen Antikörper nicht gegeben. Diese haben den entscheidenden Nachteil, stets neu produziert werden zu müssen und somit in ihrer Spezifität zu variieren.

8. Literaturverzeichnis

- Abassi ZA, Golomb E, Bridenbaugh R, Keiser HR. 1993. Metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase EC.3.4.24.11. *Br J Pharmacol*, 109(4):1024-1028.
- Ahmed SI, Thompson J, Coulson JM, Woll PJ. 2000. Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 22(4):422-431.
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, 271(34):20246-20249.
- Anggrahini DW, Emoto N, Nakayama K, Widyantoro B, Adiarto S, Iwasa N, Nonaka H, Rikitake Y, Kisanuki YY, Yanagisawa M, Hirata K. 2009. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. *Cardiovasc Res*, 82(1):143-151.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Okhubo H, Nakanishi S. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348:730-732.
- Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, Imura H. 1993. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem*, 268(5):3463-3470.
- Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, Hamaguchi H. 1991. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet*, 48:990-996.
- Attina T, Camidge R, Newby DE, Webb DJ. 2005. Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*, 91(6): 825-831.
- Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, Venuti A, Natali PG. 1999. Expression of endothelin-1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*, 59:720-727.
- Bagnato A, Cirilli A, Salani D, Simeone P, Muller A, Nicotra MR, Natali PG, Venuti A. 2002. Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res*, 62(22):6381-6384.
- Bagnato A, Rosano L. 2010. The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 40:1443-1451.

- Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curwen J, Growcott J. 2011. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *Br J Pharmacol*, 163:220-233.
- Barone FC, Globus MY, Price WJ, White RF, Storer BL, Feuerstein GZ, Busto R, Ohlstein EH. 1994. Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14(2):337-342.
- Barst RJ. 2007. Sitaxentan: a selective endothelin-A receptor antagonist, for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin Pharmacother*, 8(1):95-109.
- Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Lüscher TF. 1997. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 238(3):861-865.
- Barton M, Yanagisawa M. 2008. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol*, 86:485-498.
- Benigni A, Remuzzi G. 1996. Glomerular protein trafficking and progression of renal disease to terminal uremia. *Semin Nephrol*, 16(3):151-159.
- Bhalla A, Haque S, Taylor I, Winslet M, Loizidou M. 2009. Endothelin receptor antagonism and cancer. *Eur J Clin Invest*, 39(2):74-77.
- Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R. 2002. Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett*, 31(1-3):43-48.
- Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. 1991. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. *Genomics*, 10(1):236-242.
- Blouquit-Laye S, Regnier A, Beauchet A, Zimmermann U, Devillier P, Chinet T. 2010. Expression of endothelin receptor subtypes in bronchial tumors. *Oncol Rep*, 23(2):457-463.
- Böhm F, Pernow J. 2007. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 76(1):8-18.
- Boesen I. 2015. Endothelin receptors, renal effects and blood pressure. *Curr Opin Pharmacol*, 21:25-34.
- Borgeson DD, Grantham JA, Williamson EE, Luchner A, Redfield MM, Opgenorth TJ, Burnett JC Jr. 1998. Chronic oral endothelin type A receptor antagonism in experimental heart failure. *Hypertension*, 31(3):766-770.

- Borzacchiello G, Mogavero S, Tortorella G, Catone G, Russo M. 2010. Expression of endothelin-1 and endothelin receptor a in canine ovarian tumours. *Reprod Domest Anim*, 45(6):e465-468.
- Burrell KM, Molenaar P, Dawson PJ, Kaumann AJ. 2000. Contractile and arrhythmic effects of endothelin receptor agonists in human heart in vitro: blockade with SB 209670. *J Pharmacol Exp Ther*, 292(1):449-459.
- Burky RW. 2011. Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem*, 59(1):6-12.
- Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Dicarlo VS, Oparil S. 1995. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*, 79(6):2122-2131.
- Cirilli A, Simeone P, Muller A, Bagnato A, Venuti A. 2004. Targeting endothelin receptor type A in human cervical carcinoma cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44 Suppl 1:S72-75.
- Clavell AL, Mattingly MT, Stevens TL, Nir A, Wright S, Aarhus LL, Heublein DM, Burnett JC Jr. 1996. Angiotensin converting enzyme inhibition modulates endogenous endothelin in chronic canine thoracic inferior vena caval constriction. *J Clin Invest*, 97(5):1286-1292.
- Clozel M, Breu V, Burri K, Cassal JM, Fischli W, Gray GA, Hirth G, Löffler BM, Müller M, Neidhart W, Ramuz H. 1993. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature*, 365(6448):759-761.
- Cong N, Li Z, Shao W, Li J, Yu S. 2016. Activation of ETA receptor by endothelin-1 induces hepatocellular carcinoma cell migration and invasion via ERK1/2 and AKT signaling pathways. *J Membr Biol*, 249(1-2):119-128.
- Dasgupta F, Mukherjee AK, Gangadhar N. 2002. Endothelin receptor antagonists - an overview. *Curr Med Chem*, 9(5):549-575.
- Davenport AP, Morton AJ, Brown MJ. 1991. Localization of endothelin-1 (ET-1), ET-2, and ET-3, mouse VIC, and sarafotoxin S6b binding sites in mammalian heart and kidney. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17(Suppl. 7):S152-155.
- Davenport AP. 2002. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, 54(2):219-226.
- Davenport AP, Maguire JJ. 2006. Endothelin. *Handbook Exp Pharmacol*, 176:295-329.
- Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Pollock DM, Webb DJ, Maguire JJ. 2016. Endothelin. *Pharmacol Rev*, 68(2):357-418.

- De Campo BA, Goldie RG, Jeng AY, Henry PJ. 2002. Role of endothelin-converting enzyme, chymase and neutral endopeptidase in the processing of big ET-1, ET-1(1-21) and ET-1(1-31) in the trachea of allergic mice. *Clin Sci*, 103(48):353S-356S.
- Denault J, Claing A, D'Orléans-Juste P, Sawamura T, Kido T, Masaki T, Leduc R. 1995. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Letters*, 362:276-280.
- Dhaun N, Pollock DM, Goddard J, Webb DJ. 2007. Selective and mixed endothelin receptor antagonism in cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS)*, 28(11):573-579.
- Dieber-Rotheneder M, Beganovic S, Desoye G, Lang U, Cervar-Zivkovic M. 2012. Complex expression changes of the placental endothelin system in early and late onset preeclampsia, fetal growth restriction and gestational diabetes. *Life Sci*, 91:710-715.
- Dingemanse J, van Giersbergen PL. 2004. Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clin Pharmacokinet*, 43(15):1089-1115.
- Dockrell ME, Webb DJ, Williams BC. 1996. Activation of the endothelin B receptor causes a dose-dependent accumulation of cyclic GMP in human platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 7(2):178-180.
- Doll C, Pöll F, Peuker K, Loktev A, Glück L, Schulz S. 2012. Deciphering μ -opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *Br J Pharmacol*, 167:1259-1270.
- Donckier JE, Michel L, Van Beneden R, Delos M, Havaux X. 2003. Increased expression of endothelin-1 and its mitogenic receptor ETA in human papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 59(3):354-360.
- Donckier JE, Mertens-Strijthagen J, Flamion B. 2007. Role of the endothelin axis in the proliferation of human thyroid cancer cells. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 67(4):552-556.
- Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. 2006. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 99:570-582.
- Dübel S, Rohrbach P, Schmiedl A. 2004. Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? Rekombinante Antikörper. *Biol Unserer Zeit*, 34(6):372-379.
- Edwards RM, Trizna W, Ohlstein EH. 1990. Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol*, 259(2):217-221.
- Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffmann GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. 1990. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med*, 172(6):1741-1748.

- Eltze E, Wild PJ, Wülfing C, Zwarthoff EC, Burher M, Stoehr R, Korsching E, Hartmann A. 2009. Expression of the endothelin axis in noninvasive and superficially invasive bladder cancer: relation to clinicopathologic and molecular prognostic parameters. *Eur Urol*, 56:837-847.
- Ferri C, Pittoni V, Piccoli A, Laurenti O, Cassone MR, Bellini C, Properzi G, Valesini G, De Mattia G, Santucci A. 1995. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(3):829-835.
- Ferri C, Bellini C, Desideri G, De Mattia G, Santucci A. 1996. Endogenous insulin modulates circulating endothelin-1 concentrations in humans. *Diabetes Care*, 19(5):504-506.
- Fischgräbe J, Götte M, Michels K, Kiesel L, Wülfing P. 2009. Targeting endothelin A receptor enhances anti-proliferative and anti-invasive effects of the HER2 antibody trastuzumab in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Int J Cancer*, 127:696-706.
- Frei N, Weissenberger J, Beck-Sickinger AG, Höfliger M, Weis J, Imboden H. 2001. Immunocytochemical localization of angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II with monoclonal antibodies in the rat adrenal gland. *Regul Pept*, 101(1-3):149-155.
- Frey O, Kamradt T. 2011. Biologics. Magic bullets - magic effects - magic costs? New therapeutics and their effects. *Ophthalmologe*, 108(1):7-12.
- Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M. 1990. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest*, 96(2):1059-1065.
- Fukui R, Nishimori H, Hata F, Yasoshima T, Ohno K, Yanai Y, Kamiguchi K, Denno R, Sato N, Hirata K. 2007. Inhibitory effect of endothelin A receptor blockade on tumor growth and liver metastasis of a human gastric cancer cell line. *Gastric Cancer*, 10(2):123-128.
- Fukumoto S, Saida K, Sakai H, Ueno H, Iwano H, Uchide T. 2016. Therapeutic potential of endothelin inhibitors in canine hemangiosarcoma. *Life Sci*, 159:55-60.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373-376.
- Gärtner F, Abraham G, Kassner A, Baurichter D, Milting H. 2017. Influence of mechanical circulatory support on endothelin receptor expression in human left ventricular myocardium from patients with dilated cardiomyopathy (DCM). *PLoS ONE* 12(1):e0169896.
- Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Noordegraaf AV, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko

- W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M, ESC Scientific Document Group. 2016. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*, 37(1):67-119.
- Galsky MD, Vogelzang NJ. 2010. Docetaxel-based combination therapy for castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol*, 21(11):2135-2144.
- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 328(24):1732-1739.
- Glassberg MK, Ergul A, Wanner A, Puett D. 1994. Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10(3):316-321.
- Godara G, Pechner S, Jukic DM, D'Antonio JM, Akhavan A, Nelson JB, Pflug BR. 2007. Distinct patterns of endothelin axis expression in primary prostate cancer. *Urology*, 70:209-215.
- Gohji K, Kitazawa S, Tamada H, Katsuoka Y, Nakajima M. 2001. Expression of endothelin receptor A associated with prostate cancer progression. *J Urol*, 165:1033-1036.
- Gondo K, Ueno T, Sakamoto M, Sakisaka S, Sata M, Tanikawa K. 1993. The endothelin-1 binding site in rat liver tissue: light- and electron-microscopic autoradiographic studies. *Gastroenterol*, 104:1745-1749.
- Granger JP, Spradley FT, Bakrania BA. 2018. The endothelin system: A critical player in the pathophysiology of preeclampsia. *Curr Hyperten Rep*, 20:32.
- Grant K, Loizidou M, Taylor I. 2003. Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer*, 88:163-166.
- Grohé C, Nouskas J, Vetter H, Neyses L. 1994. Effects of nisoldipine on endothelin-1-and angiotensin II-induced immediate/early gene expression and protein synthesis in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 24(1):13-16.
- Günther T, Tulipano G, Dournaud P, Bousquet C, Csaba Z, Kreienkamp HJ, Lupp A, Korbonits M, Castaño JP, Wester HJ, Culler M, Melmed S, Schulz S. 2018. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacol Rev*, 70(4):763-835.

- Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. 2005. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Fünfte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M. 2002. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol*, 22(2):207-26.
- Hayasaki-Kajiwara Y, Naya N, Shimamura T, Iwasaki T, Nakajima M. 1999. Endothelin generating pathway through endothelin₁₋₃₁ in human cultured bronchial smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 127:1415-1421.
- Haynes WG, Webb DJ. 1998. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *Journal of Hypertension*, 16:1081-1098.
- Hayzer DJ, Rose PM, Lynch JS, Webb ML, Kienzle BK, Liu EC, Bogosian EA, Brinson E, Runge MS. 1992. Cloning and expression of a human endothelin receptor: subtype A. *Am J Med Sci*, 304(4):231-238.
- Herrmann E, Eltze E, Bierer S, Bogemann M, Brinkmann OA, Balnowair H, Hertle L, Wulfig C. 2007. Expression of the endothelin-axis in the different histologic subtypes of renal cell carcinoma: a tissue microarray analysis. *Oncol Rep*, 17:275-280.
- Hocher B, Thöne-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F. 1997. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest*, 99(6):1380-1389.
- Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thöne-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer HH, Rodman DM, Theuring F. 2000. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23(1):19-26.
- Hoeper MM, Halank M, Marx C, Hoeffken G, Seyfarth HJ, Schauer J, Niedermeyer J, Winkler J. 2005. Bosentan therapy for portopulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 25(3):502-508.
- Hoffmann E, Assennato P, Donatelli M, Colletti I, Valenti TM. 1998. Plasma endothelin-1 levels in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *Am Heart J*, 135(4):684-688.
- Hofman FM, Chen P, Jeyaseelan R, Incardona F, Fisher M, Zidovetzki R. 1998. Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *Blood*, 92(9):3064-3072.
- Hosoda K, Nakao K, Hiroshi-Arai, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H. 1991. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett*, 287(1-2):23-26.

- Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, Nakanishi S, Imura H. 1992. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem*, 267(26):18797-18804.
- Housset C, Rockey DC, Bissell DM. 1993. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:9266-9270.
- Hsieh WT, Yeh WL, Cheng RY, Lin C, Tsai CF, Huang BR, Wu CY, Lin HY, Huang SS, Lu DY. 2014. Exogenous endothelin-1 induces cell migration and matrix metalloproteinase expression in U251 human glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, 118(2):257-269.
- Hu RM, Levin ER, Pedram A, Frank HJ. 1993. Insulin stimulates production and secretion of endothelin from bovine endothelial cells. *Diabetes*, 42(2):351-358.
- Hynynen MM, Khalil RA. 2006. The vascular endothelin system in hypertension – recent patents and discoveries. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 1:95-108.
- Iglarz M, Binkert C, Morrison K, Fischli W, Gatfield J, Treiber A, Weller T, Bolli MH, Boss C, Buchmann S, Capeleto B, Hess P, Qiu C, Clozel M. 2008. Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 327(3):736-745.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:2863-2867.
- Iqbal J, Sanghia R, Das SK. 2005. Endothelin receptor antagonists: an overview of their synthesis and structure-activity relationship. *Mini Rev Med Chem*, 5(4):381-408.
- Irani S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK. 2014a. A review of the profile of endothelin axis in cancer and its management. *Crit Rev Oncol Hematol*, 89:314-321.
- Irani S, Salajegheh A, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. 2014b. Expression profile of endothelin 1 and its receptor endothelin receptor A in papillary thyroid carcinoma and their correlations with clinicopathologic characteristics. *Ann Diagn Pathol*, 18(2):43-48.
- Ishikawa K, Fukami T, Nagase T, Fujita K, Hayama T, Niiyama K, Mase T, Ihara M, Yano M. 1992. Cyclic pentapeptide endothelin antagonists with high ETA selectivity. Potency- and solubility-enhancing modifications. *J Med Chem*, 35(11):2139-2142.
- Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, Nishikibe M, Yano M. 1994. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(11):4892-4896.

- Jackman HL, Morris PW, Rabito SF, Johansson GB, Skidgel RA, Erdös EG. 1993. Inactivation of endothelin-1 by an enzyme of the vascular endothelial cells. *Hypertension*, 21:925-928.
- Jagroop IA, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP. 2005. Endothelin-1 and human platelets. *Curr Vasc Pharmacol*, 3(4):393-399.
- James ND, Caty A, Borre M, Zonnenberg BA, Beuzeboc P, Morris T, Phung D, Dawson NA. 2009. Safety and efficacy of the specific endothelin-A receptor antagonist ZD4054 in patients with hormone-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain free or mildly symptomatic: a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 2 trial. *Eur Urol*, 55(5):1112-1123.
- Juvela S. 2000. Plasma endothelin concentrations after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 92(3):390-400.
- Kaasjager KA, Koomans HA, Rabelink TJ. 1997. Endothelin-1-induced vasopressor responses in essential hypertension. *Hypertension*, 30(1):15-21.
- Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poole-Wilson PA. 1996. Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. Acute effects of bosentan, an orally active, mixed endothelin ETA and ETB receptor antagonist. *Circulation*, 93(11):2068-2079.
- Karet FE, Kuc RE, Davenport AP. 1993. Novel ligands BQ123 and BQ3020 characterize endothelin receptor subtypes ET_A and ET_B in human kidney. *Kidney Int*, 44:36-42.
- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. 1993. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET(C) receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*, 268:19126-19133.
- Kaski JC, Elliott PM, Salomone O, Dickinson K, Gordon D, Hann C, Holt DW. 1995. Concentration of circulating plasma endothelin in patients with angina and normal coronary angiograms. *Br Heart J*, 74(6):620-624.
- Kedzierski RM, Yanagisawa M. 2001. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41:851-876.
- Khimji, Al-K, Rockey D. 2010. Endothelin - Biology and disease. *Cell Signal*, 22:1615-1625.
- Kim SJ, Kim JS, Kim SW, Yun SJ, He J, Brantley E, Fan D, Strickner P, Lehembre F, Regenass U, Fidler IJ. 2012. Antivascular therapy for multidrug-resistant ovarian tumors by macitentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Transl Oncol*, 5(1):39-47.

- Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. 1988. Structure-activity relationships of endothelin: Importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun*, 156(3):1182-1186.
- Kliwer A, Reinscheid RK, Schulz S. 2017. Emerging paradigms of G protein-coupled receptor dephosphorylation. *Trends Pharmacol Sci*, 38(7):621-636.
- Ko C, Gieske MC, Al-Alem L, Hahn Y, Su W, Gong MC, Iglarz M, Koo Y. 2006. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology*, 147:1770-1779.
- Kohan DE. 1991. Endothelin synthesis by rabbit renal tubule cells. *Am J Physiol*, 261(2):221-226.
- Kohan DE, Cleland JG, Rubin LJ, Theodorescu D, Barton M. 2012. Clinical Trials with endothelin receptor antagonists: what went wrong and where can we improve? *Life Sci*, 91:528-539.
- Kohan DE, Barton M. 2014. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 86:896-904.
- Kruse HJ, Wieczorek I, Creutzig A. 1997. Cellular mechanisms of endothelial endothelin synthesis. *Vasa*, 26(3):167-172.
- Lange F, Kaemmerer D, Behnke-Mursch J, Brück W, Schulz S, Lupp A. 2018. Differential somatostatin, CXCR4 chemokine and endothelin A receptor expression in WHO grade I-IV astrocytic brain tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144(7):1227-1237.
- Larivière R, Lebel M. 2003. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*, 81(6):607-621.
- Lee ME, Bloch KD, Clifford JA, Quertermous T. 1990. Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter: evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *J Biol Chem*, 265:10446-10450.
- Levin ER. 1995. Endothelins. *N Engl J Med*, 333(6):356-363.
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917):868-874.
- Ling L, Kuc RE, Maguire JJ, Davie NJ, Webb DJ, Gibbs P, Alexander GJM, Davenport AP. 2012. Comparison of endothelin receptors in normal versus cirrhotic human liver and in the liver from endothelial cell-specific ETB knockout mice. *Life Sci*, 91:716-722.
- Ling L, Maguire JJ, Davenport AP. 2013. Endothelin-2, the forgotten isoform: emerging role in the cardiovascular system, ovarian development, immunology and cancer. *Br J Pharmacol*, 168:283-295.

- Liu Y, Yamada H, Ochi J. 1998. Immunocytochemical studies on endothelin in mast cells and macrophages in the rat gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol*, 109:301-307.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie*. Achte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Löschmann PA, Biedermann. 2010. Wichtiger Sicherheitshinweis für Ärzte über den Zusammenhang zwischen Thelin® (Sitaxentan) und schwerwiegenden Leberschädigungen. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, unter: <https://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2010/20101221.pdf>
- Luscher TF, Barton M. 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*, 102:2434-2440.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. 2009. *Der Experimentator: Immunologie*. Dritte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM, Snyder SH. 1989. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(18):7285-7289.
- Mann JF, Green D, Jamerson K, Ruilope LM, Kuranoff SJ, Littke T, Viberti G; ASCEND Study Group. 2010. Avasentan for overt diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 21(3):527-535.
- Maschauer S, Michel K, Tripal P, Büther K, Kuwert T, Schober O, Kopka K, Riemann B, Prante O. 2013. Synthesis and in vivo evaluation of an (18)F-labeled glycoconjugate of PD156707 for imaging ETA receptor expression in thyroid carcinoma by positron emission tomography. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 3(5):425-436.
- Masuo Y, Ishikawa Y, Kozakai T, Uchide T, Komatsu Y, Saida K. 2003. Vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 gene expression in the murine central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 300:661-668.
- Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. 1989. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(1):74-80.
- Matsumura Y, Ikegawa R, Tsukahara R, Takaoka M, Morimoto S. 1990. Conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 by two types of metalloproteinases derived from porcine aortic endothelial cells. *FEBS Letters*, 272:166-170.
- Matsuo Y, Mihara Si, Ninomiya M, Fujimoto M. 2001. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 32(9):2143-2148.

- Mattoli S, Soloperto M, Marini M, Fasoli A. 1991. Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol*, 88(3 Pt 1):376-384.
- McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, Barst RJ, Black C, Galiè N, Rainisio M, Simonneau G, Rubin LJ. 2005. Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 25(2):244-249.
- McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ. 1992. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation*, 85(4):1374-1379.
- McPhee SJ, Hammer GD. 2010. *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*. Sixth Edition. New York: McGraw Hill.
- Meidan R, Levy N. 2007. The ovarian endothelin network: an evolving story. *Trends Endocrinol Metab*, 18:379-385.
- Meli S, Bruno CM. 2001. Endothelin and diabetic nephropathy: a new pathogenic factor? *Panminerva Med*, 43(1):45-48.
- Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, Sugishita Y, Suzuki N, Fujino M, Ajisaka R, Goto K, Masaki T. 1989. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet*, 2(8653):53-54.
- Moody TW, Hill JM, Jensen RT. 2003. VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides*, 24:163-177.
- Motte S, McEntee K, Naeije R. 2006. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther*, 110(3):386-414.
- Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. 2003a. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(2):110-116.
- Nelson JB, Nabulsi AA, Vogelzang NJ, Breul J, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC, Carducci MA. 2003b. Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor antagonist atrasentan. *J Urol*, 169:1143-1149.
- Nelson JB, Love W, Chin JL, Saad F, Schulman CC, Sleep DJ, Qian J, Steinberg J, Carducci M; Atrasentan Phase 3 Study Group. 2008. Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*, 113(9):2478-2487.
- Neuhofer W, Pittrow D. 2009. Endothelin receptor selectivity in chronic kidney disease: rationale and review of recent evidence. *Eur J Clin Invest*, 39(S2):50-67.

- Neumann J. 2008. Immunbiologie: Eine Einführung. Erste Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Neumann ZL, Pondenis HC, Masyr A, Byrum ML, Wycislo KL, Fan TM. 2015. The association of endothelin-1 signaling with bone alkaline phosphatase expression and protumorigenic activities in canine osteosarcoma. *J Vet Intern Med*, 29(6):1584-1594.
- Noll G, Wenzel RR, Lüscher TF. 1996. Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. *Mol Cell Biochem*, 157(1-2):259-267.
- Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H. 1991. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 178(1):248-255.
- Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliott JD, Sung CP. 1992. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur J Pharmacol*, 225(4):347-350.
- Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarsland T, Dickstein K. 1994. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*, 89(4):1573-1579.
- O'Reilly G, Charnock-Jones DS, Morrison JJ, Cameron IT, Davenport AP, Smith SK. 1993. Alternatively spliced mRNAs for human endothelin-2 and their tissue distribution. *Biochem Biophys Res Commun*, 193(3):834-840.
- Ortmann J, Nett PC, Celeiro J, Traupe T, Tornillo L, Hofmann-Lehmann R, Haas E, Frank B, Terraciano LM, Barton M. 2005. Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: Evidence for endothelin release by pancreatic islet β -cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(2):689-695.
- Parker JD, Thiessen JJ. 2004. Increased endothelin-1 production in patients with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(3):H1141-H1145.
- Pavlos NJ, Friedman PA. 2017. CPCR signaling and trafficking: the long and the short of it. *Trends Endocrinol Metab*, 28(3):213-226.
- Perfetto F, Tarquini R, de Leonardis V, Piluso A, Lombardi V, Tarquini B. 1995. Angiopathy affects circulating endothelin-1 levels in type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol*, 32(4):263-267.
- Petrich A, Mann A, Kliwer A, Nagel F, Strigli A, Märtens JC, Pöll F, Schulz S. 2013. Phosphorylation of threonine 333 regulates trafficking of the human sst5 somatostatin receptor. *Mol Endocrinol*, 27:671-682.

- Petrov T, Rafols JA. 2001. Acute alterations of endothelin-1 and iNOS expression and control of the brain microcirculation after head trauma. *Neurol Res*, 23(2-3):139-143.
- Pflug BR, Zheng H, Udan MS, D'Antonio JM, Marshall FF, Brooks JD, Nelson JB. 2007. Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET_A receptor. *Cancer Lett*, 246:139-148.
- Piacentini L, Gray M, Honbo NY, Chentoufi J, Bergman M, Karliner JS. 2000. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol*, 32(4):565-576.
- Pieske B, Beyersmann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G. 1999. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation*, 99(14):1802-1809.
- Pöll F, Doll C, Schulz S. 2011. Rapid dephosphorylation of G protein-coupled receptors by protein phosphatase 1 β is required for termination of β -arrestin-dependent signaling. *J Biol Chem*, 23:32931-32936.
- Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galiè N, Ghofrani HA, Jansa P, Jing ZC, Le Brun FO, Mehta S, Mittelholzer CM, Perchenet L, Sastry BK, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin LJ, Simonneau G; SERAPHIN Investigators. 2013. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 369(9):809-818.
- Qiao L, Liang Y, Li N, Hu X, Luo D, Gu J, Lu Y, Zheng Q. 2015. Endothelin-A receptor antagonists in prostate cancer treatment - a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 8(3):3465-3473.
- Randall MD, Douglas SA, Hiley CR. 1989. Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat. *Br J Pharmacol*, 98:685-699.
- Reubi JC, Waser B. 2003. Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30(5):781-793.
- Rink L, Kruse A, Haase H. 2012. *Immunologie für Einsteiger*. Erste Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Rivera-Lebron BN, Risbano MG. 2017. Ambrisentan: a review of its use in pulmonary arterial hypertension. *Ther Adv Respir Dis*, 11(6):233-244.
- Rosano L, Spinella F, Bagnato A. 2013. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 13(9):637-651.

- Rosano L, Bagnato A. 2016. Endothelin therapeutics in cancer: Where are we? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 310(6):R469-475.
- Roux S, Löffler BM, Gray GA, Sprecher U, Clozel M, Clozel JP. 1995. The role of endothelin in experimental cerebral vasospasm. *Neurosurgery*, 37(1):78-85.
- Rozengurt N, Springall DR, Polak JM. 1990. Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J Pathol*, 160(1):5-8.
- Rubanyi GM, Polokoff MA. 1994. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46(3):325-415.
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. 2002. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 346(12):896-903.
- Ruetten H, Thiemermann C. 1997. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol*, 48(4):675-688.
- Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. 1998. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ Res*, 83:314-321.
- Russell FD, Davenport AP. 1999. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol*, 126(2):391-398.
- Said N, Theodorescu D. 2012. Permissive role of endothelin receptors in tumor metastasis. *Life Sci*, 91:522-527.
- Said N, Smith S, Sanchez-Carbayo M, Theodorescu D. 2014. Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer. *J Clin Invest*, 121(1):132-47.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, 348:732-735.
- Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosanò L, Tecce R, Venuti A, Natali PG, Bagnato A. 2000. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol*, 157(5):1537-1547.
- Samara E, Dutta S, Cao G, Granneman GR, Dordal MS, Padley RJ. 2001. Single-dose pharmacokinetics of atrasentan, an endothelin-A receptor antagonist. *J Clin Pharmacol*, 41(4):397-403.

- Schiffrin EL, Thibault G. 1991. Plasma endothelin in human essential hypertension. *Am J Hypertens*, 4(4 Pt 1):303-308.
- Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Weise W, Höllt V, Schulz S. 2004. Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res*, 10(24):8235-8242.
- Schulz S, Röcken C, Ebert MP, Schulz S. 2006. Immunocytochemical identification of low-affinity NTS2 neurotensin receptors in parietal cells of human gastric mucosa. *J Endocrinol*, 191(1):121-128.
- Schulz S, Lehmann A, Kliewer A, Nagel F. 2014. Fine-tuning somatostatin receptor signaling by agonist-selective phosphorylation and dephosphorylation: IUPHAR Review 5. *Br J Pharmacol*, 171:1591-1599.
- Schulz S, Mann A, Novakhov B, Piggins HD, Lupp A. 2015. VPAC2 receptor expression in human normal and neoplastic tissues: evaluation of the novel MAB SP235. *Endocr Connect*, 4(1):18-26.
- Schumacher WA, Steinbacher TE, Allen GT, Ogletree ML. 1990. Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *Prostaglandins*, 40(1):71-79.
- Shah R. 2007. Endothelins in health and disease. *Eur J Intern Med*, 18(4):272-282.
- Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion JD, Zalewski A. 1996. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation*, 93(2):340-348.
- Shi L, Zhou SS, Chen WB, Xu L. 2017. Functions of endothelin-1 in apoptosis and migration in hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med*, 13(6):3116-3122.
- Shiba R, Sakurai T, Yamada G, Morimoto H, Saito A, Masaki T, Goto K. 1992. Cloning and expression of rat preproendothelin-3 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 186:588-594.
- Shigeno T, Clozel M, Sakai S, Saito A, Goto K. 1995. The effect of bosentan, a new potent endothelin receptor antagonist, on the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Neurosurgery*, 37(1):87-90.
- Shin SJ, Lee YJ, Tsai JH. 1996. The correlation of plasma and urine endothelin-1 with the severity of nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest*, 56(6):571-576.

- Shinmi O, Kimura S, Yoshizawa T, Sawamura T, Uchiyama Y, Sugita Y, Kanazawa I, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. 1989. Presence of endothelin-1 in porcine spinal cord: isolation and sequence determination. *Biochem Biophys Res Commun*, 162(1):340-346.
- Simonson MS, Herman WH. 1993. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem*, 268(13):9347-9357.
- Smollich M, Götte M, Kersting C, Fischgräbe J, Kiesel L, Wülfing P. 2008. Selective ET_AR antagonist atrasentan inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res Treat*, 108:175-182.
- Smollich M, Götte M, Fischgräbe J, Macedo LF, Brodie A, Chen S, Radke I, Kiesel L, Wülfing P. 2010. ETAR antagonist ZD4054 exhibits additive effects with aromatase inhibitors and fulvestrant in breast cancer therapy, and improves in vivo efficacy of anastrozole. *Breast Cancer Res Treat*, 123(2):345-357.
- Sone M, Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Satoh F, Mouri T, Shibahara S. 2000. Expression of endothelin-1 and endothelin receptors in cultured human glioblastoma cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36(5 Suppl 1):S390-392.
- Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. 1991. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 18(1):38-43.
- Stösser S, Agarwal N, Tappe-Theodor A, Yanagisawa M, Kuner R. 2010. Dissecting the functional significance of endothelin A receptors in peripheral nociceptors in vivo via conditional gene deletion. *Pain*, 148:206-214.
- Sütsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim JH, Rickenbacher P, Bertel O. 1998. Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation*, 98(21):2262-2268.
- Sugden PH, Bogoyevitch MA. 1996. Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. *Trends Cardiovasc Med*, 6(3):87-94.
- Sugden PH. 2003. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*, 35(8):871-886.
- Suzuki R, Masaoka H, Hirata Y, Marumo F, Isotani E, Hirakawa K. 1992. The role of endothelin-1 in the origin of cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 77(1):96-100.
- Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y. 1993. Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 191(3):823-830.

- Tanaka H, Moroi K, Iwai J, Takahashi H, Ohnuma N, Hori S, Takimoto M, Nishiyama M, Masaki T, Yanagisawa M, Sekiya S, Kimura S. 1998. Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization. *J Biol Chem*, 273(18):11378-11383.
- Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F. 1992. Different localization of two types of endothelin receptor mRNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *J Clin Invest*, 90(1):107-112.
- Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. 2018. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ*, 360:j5492.
- Tsutamoto T, Wada A, Maeda Y, Adachi T, Kinoshita M. 1994. Relation between endothelin-1 spillover in the lungs and pulmonary vascular resistance in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 23(6):1427-1433.
- Uchide T, Fujimori Y, Temma K, Sasaki T, Kizaki K, Hara Y, Takizawa S, Saida K. 2004. cDNA cloning, sequence analysis and organ distribution of horse preproendothelin-2. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44(1):S430-434.
- Vatter H, Seifert V. 2006. Ambrisentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev*, 24(1):63-76.
- Venuti A, Salani D, Manni V, Poggiali F, Bagnato A. 2000. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in HPV-associated cervical carcinoma: new potential targets for anticancer therapy. *FASEB J*, 14(14):2277-2283.
- Vignon-Zellweger N, Heiden S, Miyauchi T, Emoto N. 2012. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sci*, 91:490-500.
- Wada K, Tabuchi H, Ohba R, Satoh M, Tachibana Y, Akiyama N, Hiraoka O, Asakura A, Miyamoto C, Furuichi Y. 1990. Purification of an endothelin receptor from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*, 167(1):251-257.
- Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W, Binder BR. 1992. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 267:16066-16068.
- Wang R, Dashwood RH. 2011. Endothelins and their receptors in cancer: identification of therapeutic targets. *Pharmacol Res*, 63(6):519-524.
- Warren R, Liu G. 2008. ZD4054: a specific endothelin A receptor antagonist with promising activity in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 17(8):1237-1245.

- Watanabe K, Hiraki H, Hasegawa H, Tanigawa T, Ernura I, Honma K, Shibuya H, Fukuda T, Suzuki T. 1997. Immunohistochemical localization of endothelin-1, endothelin-3 and endothelin receptors in human pheochromocytoma and paraganglioma. *Pathol Int*, 47(8):540-546.
- Watson AM, Li J, Schumacher C, de Gasparo M, Feng B, Thomas MC, Allen TJ, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. 2010. The endothelin receptor antagonist avosentan ameliorates nephropathy and atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*, 53(1):192-203.
- Watts SW. 2010. Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298(2):254-260.
- Weissberg PL, Witchell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metcalfe JC. 1990. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 85(2-3):257-262.
- Wendel M, Knels L, Kummer W, Koch T. 2006. Distribution of endothelin receptor subtypes ET_A and ET_B in the rat kidney. *J Histochem Cytochem*, 54(11):1193-1203.
- Wilson DB, Dorfman DM, Orkin SH. 1990. A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 10:4854-4862.
- Wülfing P, Diallo R, Kersting C, Wülfing C, Poremba C, Rody A, Greb RR, Böcker W, Kiesel L. 2003. Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clin Cancer Res*, 9:4125-4131.
- Wülfing P, Kersting C, Tio J, Fischer RR, Wülfing C, Poremba C, Diallo R, Böcker W, Kiesel L. 2004a. Endothelin-1, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 10:2393-23400.
- Wülfing P, Tio J, Kersting C, Sonntag B, Buerger H, Wülfing C, Euler U, Boecker W, Tulusan AH, Kiesel L. 2004b. Expression of endothelin-A-receptor predicts unfavourable response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Br J Cancer*, 91:434-440.
- Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, de Wit D, Yanagisawa M. 1994. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*, 78(3):473-485.

- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332:411-415.
- Yanagisawa M, and Masaki T. 1989. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci*, 10:374-378.
- Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, Nakagawa K, Hamada T, Otani S, Yanagisawa M, Takeda T. 1991. Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann Intern Med*, 114(3):213-215.
- Yu JCM, Davenport AP. 1995. Secretion of endothelin-1 and endothelin-3 by human cultured vascular smooth muscle cells. *Brit J Pharmacol*, 114:551-557.
- Zeicher AM, Ihling C, Pistorius K, Schächinger V, Schaefer HE. 1994. Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet*, 344(8934):1405-1406.
- Zoja C, Morigi M, Figliuzzi M, Bruzzi I, Oldroyd S, Benigni A, Ronco P, Remuzzi G. 1995. Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis*, 26(6):934-941.

9. Anhang

9.1. Lebenslauf und Veröffentlichung

Veröffentlichung

Lupp A, Mann A, Heeb A, Kaemmerer D, Sängler J, Evert M, Evert K, Mawrin C, Schulz S. 2015. Reassessment of endothelin receptor A expression in normal and neoplastic human tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-8. *Peptides*, 66:19-25.

9.2. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. med. habil. A. Lupp,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Alexander Heeb

9.3. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau apl. Prof. Dr. med. A. Lupp für die Vergabe des Dissertationsthemas bedanken. Zu tiefer Dankbarkeit bin ich ihr für das immer und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stehen, für hervorragende und wunderbare fachliche sowie menschliche Unterstützung und für ihre unermüdliche Geduld bei den Experimenten, während der Datenauswertung und beim späteren Niederschreiben der Ergebnisse verpflichtet.

Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. A. Mann und den anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die stets freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft während meiner Tätigkeit im Institut.

Ganz besonders danke ich meiner Frau und meinen Kindern, die mich während der gesamten Arbeit unterstützt und ermutigt haben.

Außerordentlicher Dank gebührt meinen Eltern, die mir das alles erst ermöglicht haben.